

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Mgr. Marie Zábranská

Analýza rostlinných galaktolipidů pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie

Analysis of plant galactolipids by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectrometry

Rigorózní práce

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze a Ústav organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. je možné pouze po písemném souhlasu těchto institucí.

V Praze dne.....

.....

podpis

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala doc. RNDr. Josefu Cvačkovi, Ph.D., pod jehož vedením vznikla publikace, která je předmětem této rigorózní práce. Jsem velice ráda, že jsem mohla být součástí týmu a získat velmi cenné zkušenosti.

Můj dík patří také všem členům skupiny Hmotnostní spektrometrie Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR, v.v.i. Zvláště ráda bych chtěla poděkovat Evě Harazim, Květě Kertisové a Vladimíru Vrkoslavovi.

Abstrakt

Pro analýzu monogalaktoxydiacylglycerolů (MGDG) a digalaktoxydiacylglycerolů (DGDG) byly vyvinuty metody založené na RP-HPLC/ESI-MS² s využitím datově závislého skenu. Optimalizací podmínek bylo docíleno efektivní separace oxidovaných i neoxidovaných MGDG a DGDG na koloně Nucleosil C18 s binárním gradientem methanolu s vodou v případě MGDG a ternárním gradientem acetonitrilu, methanolu a vody v případě DGDG. Nejprve byla pozorována eluce oxidovaných galaktolipidů a následovala eluce neoxidovaných galaktolipidů, u nichž byla zjištěna souvislost elučního chování s počtem ekvivalentů uhlíků. Vzhledem k velké podobnosti fragmentačních hmotnostních spekter oxidovaných a neoxidovaných galaktolipidů byla demonstrována nutnost použití hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením pro správnou identifikaci oxidovaných a neoxidovaných forem MGDG a DGDG. Metody byly použity pro charakterizaci galaktolipidů z listů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a meduňky lékařské (*Melissa officinalis*).

Abstract

Data dependent RP-HPLC/ESI-MS² methods have been developed for the analysis of monogalactosyldiacylglycerols (MGDGs) and digalactosyldiacylglycerols (DGDGs). The methods allow the efficient separation of non-oxidised and oxidised galactolipids and their unambiguous characterisation based on their collision induced dissociation (CID) and exact mass measurement. The optimised reversed-phase chromatographic systems are based on a 2.0 mm i.d. Nucleosil C18 column and methanol/water (MGDGs) or acetonitrile/methanol/water (DGDGs) gradients. The oxidised galactolipids eluted before the non-oxidised ones and the retention order of the non-oxidised species was found to follow the equivalent carbon number. The use of exact mass measurement MS was demonstrated to be essential for distinguishing the mass spectra of the oxidised and non-oxidised species and thus for their correct interpretation. The methods were applied for the characterisation of the MGDGs and DGDGs in the leaves of *Arabidopsis thaliana* and *Melissa officinalis*.

Klíčová slova

Digalaktosyldiacylglyceroly, hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, monogalaktosyldiacylglyceroly, počet ekvivalentů uhlíků, vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi

Keywords

Accurate mass measurement, digalactosyldiacylglycerols, equivalent carbon number, monogalactosyldiacylglycerols, reversed-phase high performance liquid chromatography

Obsah

1	Úvod	8
1.1	Cíl práce	9
2	Teoretická část	10
2.1	Galaktolipidy	10
2.2	Oxylipiny	11
2.3	Analýza galaktolipidů	12
3	Metodika	14
3.1	Rostlinný materiál	14
3.2	Extrakce lipidů z listů	14
3.3	Tenkovrstvá chromatografie	15
3.4	Vysokoučinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí	15
4	Výsledky a diskuse	17
4.1	Hmotnostní spektra galaktolipidů	17
4.2	Retenční chování galaktolipidů	20
4.3	Galaktolipidy z huseníčku a meduňky	22
5	Závěr	24
6	Seznam bibliografických citací	25
7	Příloha	29

Seznam zkratk a symbolů

BHT	butylovaný hydroxytoluen, 2,6-di- <i>terc</i> -butyl-4-methylfenol
CID	kolizemi indukovaná disociace
CN:DB	poměr celkového počtu uhlíků a celkového počtu dvojných vazeb v acylech lipidu
DGDG	digalaktosyldiacylglycerol
dn-oPDA	dinor-12-oxofytodienová kyselina
ECN	počet ekvivalentů uhlíků („Equivalent Carbon Number“)
ESI	ionizace elektrosprejem
FT-ICR	iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací
IT	iontová past
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii
m/z	poměr hmotnosti ku náboji
MGDG	monogalaktosyldiacylglycerol
MS/MS (MS^2)	tandemová hmotnostní spektrometrie
oPDA	12-oxofytodienová kyselina
QqQ	trojitý kvadrupól
Q-TOF	hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem doby letu
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s reverzními fázemi
TLC	tenkovrstvá chromatografie
t_R	retenční čas
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie

1 Úvod

Lipidy jsou jednou ze základních stavebních jednotek živé hmoty, utvářejí strukturu biologických membrán a jsou zdrojem energie v metabolismu. Výzkum lipidů v rámci rostlinné říše odhaluje jejich úlohu např. při fotosyntéze, růstu a vývoji rostlin, buněčné signalizaci a reakcích na biotický a abiotický stres [1].

Galaktolipidy jsou přímou součástí fotosyntetického aparátu [2]. Jedná se o monogalaktosyldiacylglyceroly (MGDG) a digalaktosyldiacylglyceroly (DGDG). Jednotlivé molekuly MGDG a DGDG se liší přítomností mastných kyselin vázaných v poloze *sn*-1 a *sn*-2 na glycerolu [3]. Nenasycené mastné kyseliny mohou podléhat oxidaci (enzymaticky řízené, nebo autooxidaci) a vznikají tak velmi komplexní směsi [4]. Detailní analýza složení MGDG a DGDG u různých rostlinných druhů a za různých podmínek přináší poznatky o fylogenetickém vývoji rostlin a jejich adaptabilitě na stres. Zájem o studium galaktolipidů mimo jiné vzrůstá i pro jejich protinádorové, protivirové a protizánětlivé účinky [5-7].

V rámci této práce byly MGDG a DGDG izolovány z listů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a meduňky lékařské (*Melissa officinalis*). Separace galaktolipidů byla prováděna v systému vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzními fázemi (RP-HPLC). Eluční chování bylo studováno ve vztahu k počtu ekvivalentů uhlíků (ECN). V rámci hmotnostní spektrometrie byla používána elektrosprejová ionizace (ESI). Hmotnostní spektra byla měřena za podmínek nízkého (sférická iontová past) a vysokého rozlišení (orbitrapová iontová past).

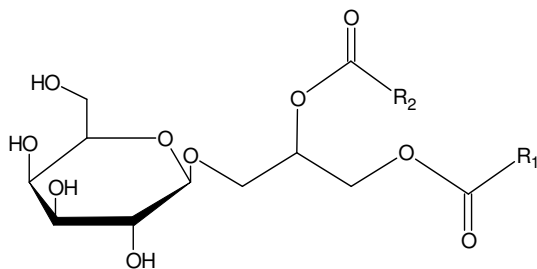
1.1 Cíl práce

Cílem této práce je optimalizace chromatografických a hmotnostně-spektrometrických podmínek pro dosažení co nejúčinnější separace a jednoznačné identifikace co největšího počtu galaktolipidů.

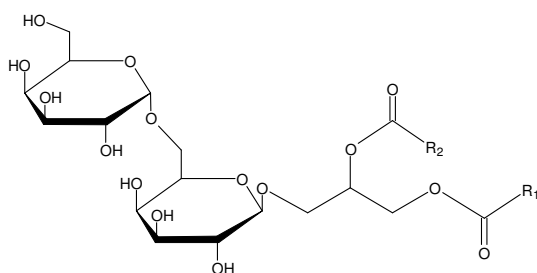
2 Teoretická část

2.1 Galaktolipidy

Studované galaktolipidy, tedy monogalaktosyldiacylglyceroly (MGDG) a digalaktosyldiacylglyceroly (DGDG), se dle názvosloví IUPAC řadí do skupiny glycerolipidů [8]. Poprvé byly MGDG a DGDG izolovány z pšeničné mouky v roce 1956 [9]. Jsou to polární komplexní lipidy složené z galaktosy a glycerolu, na kterém jsou v poloze *sn*-1 a *sn*-2 vázány mastné kyseliny. Na **obr. 1** je uvedena struktura 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*- β -D-galaktopyranosyl-*sn*-glycerolu (MGDG). Na **obr. 2** je uvedena struktura 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*-(α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-galaktopyranosyl)-*sn*-glycerolu (DGDG). V tomto stereoisomerním uspořádání se MGDG a DGDG vyskytují nejčastěji [3].



Obr. 1: 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*- β -D-galaktopyranosyl-*sn*-glycerol (MGDG).



Obr. 2: 1,2-di-*O*-acyl-3-*O*-(α -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-galaktopyranosyl)-*sn*-glycerol (DGDG).

MGDG a DGDG tvoří v rostlinné říši stavební jednotky chloroplastů. V membránách thylakoidů jsou MGDG a DGDG zastoupeny přibližně z 50 %, respektive z 30 % celkových lipidů [2]. Biosyntéza MGDG a DGDG souvisí s evolučním vývojem rostlin a probíhá eukaryotickou nebo prokaryotickou cestou [10]. Typ biosyntézy je nejčastěji určován podle MGDG, které jsou syntetizovány jako první. Eukaryotická biosyntéza

probíhá v chloroplastech a endoplazmatickém retikulu, vznikající MGDG jsou charakteristické přítomností osmnácti uhlíkaté nenasycené mastné kyseliny se třemi dvojnými vazbami (18:3) v poloze *sn*-2 na glycerolu. Nejčastěji se jedná o *cis,cis,cis*-oktadeka-9,12,15-trienovou kyselinu a rostliny využívající tento typ biosyntézy jsou proto nazývány 18:3 rostliny. Prokaryotická biosyntéza probíhá pouze v chloroplastech. Vznikající MGDG jsou charakteristické přítomností šestnácti uhlíkaté nenasycené mastné kyseliny se třemi dvojnými vazbami (16:3) v poloze *sn*-2 na glycerolu. Nejčastěji se jedná o *cis,cis,cis*-hexadeka-7,10,13-trienovou kyselinu a rostliny s tímto typem biosyntézy jsou nazývány 16:3 rostliny [10-14].

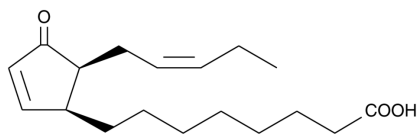
Zastoupení mastných kyselin v MGDG a DGDG je také ovlivněno okolními podmínkami. Nejvýraznější rozdíly jsou pozorovány při změnách teploty. Při nižších teplotách jsou v membránových lipidech více zastoupeny nenasycené mastné kyseliny a při vyšších teplotách naopak nasycené mastné kyseliny [15, 16].

2.2 Oxylipiny

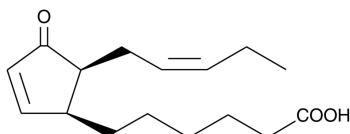
Oxylipiny vznikají enzymatickou nebo chemickou oxidací polynenasycených mastných kyselin. V obou případech dochází v první fázi k tvorbě hydroperoxidů. V případě oxylipinů vzniklých enzymatickou cestou je produkt oxidace vždy specifický pro daný enzym [4]. Kupříkladu v případě kyseliny linolové (*cis,cis*-oktadeka-9,12-dienová kyselina) vznikají enzymatickou oxidací vždy hydroperoxy v poloze 9 nebo 13 na uhlovodíkovém řetězci [17]. V případě chemické oxidace nejsou vznikající oxylipiny polohově specifické [4, 17, 18].

Oxylipiny v rostlinách vznikají při reakci na mechanické poškození, napadení patogenem, nedostatek vody, stárnutí atd. [19]. Molekuly oxylipinů nejčastěji obsahují hydroperoxy, hydroxykyseliny, oxokyseliny a kyselinu jasmonovou [4, 20]. Vznikající oxylipiny mohou být esterifikovány v membránových lipidech. Tento jev byl dosud nejlépe popsán na modelové rostlině huseníčku rolním (*Arabidopsis thaliana*) [21, 22]. V tomto případě jsou nejznámějšími esterifikovanými oxylipiny takzvané arabidopsidy obsahující prekurzory kyseliny jasmonové, 12-oxofytodienovou kyselinu (oPDA) a dinor-12-oxofytodienovou kyselinu (dn-oPDA). Jejich struktura je uvedena na **obr. 3** a **obr. 4**. Detailně bylo popsáno sedm arabidopsidů (arabidopsidy

A-G) obsahujících oPDA, respektive dn-oPDA esterifikované na membránové MGDG a DGDG [23-26].



Obr. 3: 4-oxo-5S-(2Z)-2-penten-1-yl-2-cyklopenten-1S-oktanová kyselina (oPDA).



Obr. 4: 4-oxo-5S-(2Z)-2-penten-1-yl-2-cyklopenten-1S-hexanová kyselina (dn-oPDA).

2.4 Analýza galaktolipidů

K analýze MGDG a DGDG jsou nejčastěji používány dva přístupy. První z nich je lipidomické profilování a druhou možností je (U)HPLC separace. Obě uvedené varianty se dnes prakticky výlučně používají v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Lipidomické profilování umožňuje rychlou a přehlednou analýzu majoritních složek ve vzorku lipidů [1, 25, 27-29]. U(HPLC) separace naopak poskytují možnost detailnější analýzy majoritních i minoritních složek vzorku. Pro RP-U(HPLC) separace galaktolipidů je nejčastěji používána silikagelová kolona s chemicky vázanou oktadecylovou stacionární fází [30-32]. Mobilní fáze nejčastěji obsahuje acetonitril a/nebo methanol s vodou, případně aditiva usnadňující ionizaci galaktolipidů [33-35]. Využívána je isokratická i gradientová eluce.

Eluční chování lze studovat ve vztahu k počtu ekvivalentů uhlíků (ECN). Tento vztah je běžně používán v HPLC separacích neutrálních lipidů. Vyjadřuje závislost retence daného lipidu na délce řetězce a počtu dvojných vazeb v acylech lipidu [36, 37]. ECN vypočítáme podle vztahu (1).

$$\text{ECN} = \text{CN} - 2\text{DB} \quad (1)$$

kde ECN je počet ekvivalentů uhlíků, CN je celkový počet uhlíků v acylech lipidu a DB je celkový počet dvojných vazeb v acylech lipidu.

U polárních lipidů není využití ECN běžné a není tedy zcela zřejmé, jak budou polární cukerné zbytky, případně oxidované mastné kyseliny zasahovat do elučního chování hodnoceného ve vztahu k ECN. Využití ECN u galaktolipidů bylo doposud popsáno pro neoxidované DGDG [38, 39].

V rámci hmotnostní spektrometrie MGDG a DGDG je nejčastěji používána elektrosprejová ionizace (ESI) ve spojení s analyzátory typu IT (iontová past), QqQ (trojitý kvadrupól), Q-TOF (hybridní hmotnostní spektrometr s kvadrupólovým analyzátozem a analyzátozem doby letu) a FT-ICR (iontová cyklotronová rezonance s Fourierovou transformací) [22, 33, 40-44]. V kladném módu ESI jsou nejčastěji identifikovány sodné adukty $[M+Na]^+$ a v záporném módu ESI deprotonované molekuly $[M-H]^-$. Jednotlivé galaktolipidy jsou identifikovány z fragmentačních hmotnostních spekter, přičemž poloha mastných kyselin na glycerolu může být určena podle intenzity odpovídajících fragmentů [45].

3 Metodika

3.1 Rostlinný materiál

MGDG a DGDG byly izolovány z listů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) a meduňky lékařské (*Melissa officinalis*). Huseníček rolní byl pěstován na sterilním médiu ze semen po dobu šesti týdnů v Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v.v.i. Rostliny meduňky lékařské byly zakoupeny v obchodě s potravinami.

Použité rostliny nebyly před izolací MGDG a DGDG záměrně stresovány.

3.2 Extrakce lipidů z listů

Čerstvé listy (15 g) byly natrhány a umístěny do Erlenmayerovy baňky. K připraveným listům bylo přidáno 30 ml 0,01% roztoku BHT v propan-2-olu (w/v). Následovalo zahřívání na vodní lázni při 75 °C po dobu 15 minut. Poté bylo přidáno 15 ml chloroformu¹ a 6 ml deionizované vody. Následovalo třepání jednu hodinu na třepačce. Získaný extrakt byl Pasteurovou pipetou převeden do čisté Erlenmayerovy baňky. Do extrakční baňky (s listy) bylo přidáno 20 ml směsi chloroform:methanol (2:1, v/v). Následovalo třepání 1 hodinu. Získaný extrakt byl přidán do Erlenmayerovy baňky s extraktem po prvním třepání. Postup s přidavkem 20 ml směsi chloroform:methanol (2:1, v/v) a následným třepáním a odebráním extraktu byl opakován čtyřikrát.

Ke spojenému extraktu bylo přidáno 10 ml roztoku chloridu draselného ve vodě (1 mol/l). Extrakt byl promíchán na Vortexu. Po pěti minutách stání byla Pasteurovou pipetou odsáta horní vrstva. Ke zbylému extraktu bylo přidáno 10 ml deionizované vody a postup byl opakován.

Ke zbylému extraktu byl přidán vyžíhaný síran hořečnatý (cca 7 g) a po promíchání na Vortexu byl získaný extrakt přefiltrován ve skleněné kolonce s extrahovanou vatou. Finální extrakt byl odpařen na vakuové odparce na přibližně třetinový objem (170 mbar, 40 °C). Extrakty byly skladovány v mrazáku (-20 °C).

¹ Pro experimenty byl vždy používán destilovaný chloroform stabilizovaný 1 % ethanolu.

3.3 Tenkovrstvá chromatografie

Pro preparativní TLC byly používány skleněné destičky (36 x 76 mm) se silikagelem (silikagel 60G, Merck, Darmstadt, Německo) a 12 % sádry. Mobilní fáze obsahovala chloroform:methanol:vodu (80:18:2, v/v/v). Pro vizualizaci MGDG a DGDG pod UV zářením byl používán postřik 0,05% roztokem primulinu v methanolu s vodou (8:2, v/v). Zóny odpovídající MGDG a DGDG byly ze silikagelu extrahovány ve skleněné kolonce směsí chloroform:methanol (2:1, v/v). Po odpaření do konstantní hmotnosti pod proudem dusíku byly získané MGDG a DGDG rozpuštěny ve směsi chloroform:methanol (2:1, v/v) na koncentraci 1 mg/ml. Takto získané vzorky byly skladovány v mrazáku (-20 °C).

3.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Pro RP-HPLC/MS analýzy byly používány dva systémy. První z nich se skládal z gradientového čerpadla Rheos Allegro, automatického dávkovače SpectraSYSTEM® AS 3000 a hmotnostního spektrometru LCQ Fleet s 3D iontovou pastí. Druhý systém se skládal z gradientového čerpadla Rheos Allegro, automatického dávkovače CTC-Pal a hybridního hmotnostního spektrometru LTQ Orbitrap XL (lineární iontová past a orbitrapová past) s Fourierovou transformací. U obou hmotnostních spektrometrů byla používána elektrosprejová ionizace. Pro sběr dat a vyhodnocení chromatogramů byl použit program Xcalibur, verze 2.0.7. Všechny přístroje (a program) byly vyrobeny společností Thermo Fischer Scientific (USA).

Pro RP-HPLC byla u obou výše uvedených systémů používána kolona Nucleosil C18 (250 mm x 2 mm, 5 µm, Macherey-Nagel, Německo) s předkolonou Phenomenex C18 (4 mm x 2 mm, Phenomenex, USA). Kolona byla temperována na 30 °C v termostatu RT04 (Labio, ČR). Dávkováno bylo 5 µl vzorku. Průtok mobilní fáze byl 200 µl/min. V **tabulce 1** a **tabulce 2** je uvedeno složení optimalizovaného gradientu pro separace MGDG, respektive DGDG.

Tabulka 1: Složení optimalizovaného gradientu pro separace MGDG

t [min]	methanol [%]	voda [%]
0	75	25
80	100	0
90	100	0

Tabulka 2: Složení optimalizovaného gradientu pro separace DGDG

t [min]	acetonitril [%]	voda [%]	methanol [%]
0	65	35	0
50	80	0	20
60	0	0	100
80	0	0	100

Detailní metodika je uvedena v příloze.

4 Výsledky a diskuse

Výsledky byly převzaty z publikace: Analysis of plant galactolipids by reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with accurate mass measurement (Zábranská et al. 2012), viz příloha.

4.1 Hmotnostní spektra galaktolipidů

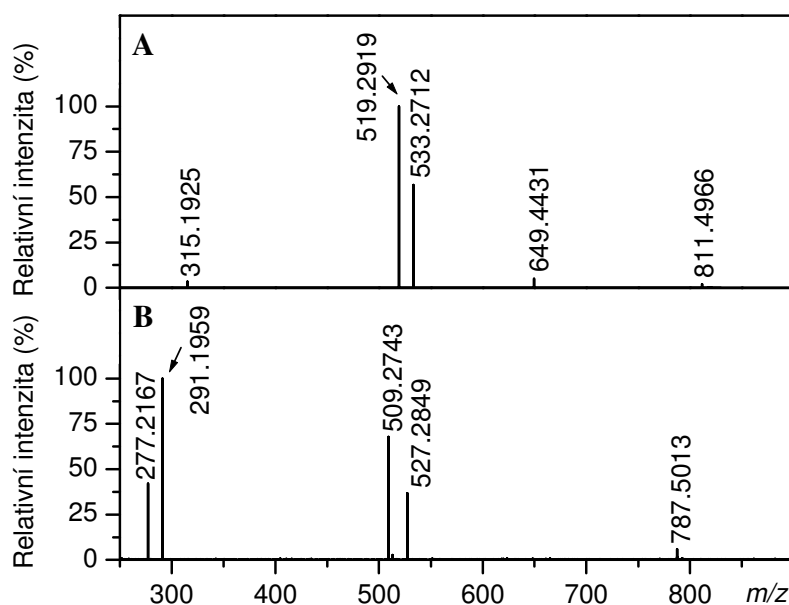
Hmotnostní spektra neoxidovaných MGDG a DGDG byla měřena v kladném i záporném módu ESI s využitím komerčně dostupných standardů. V kladném módu byly identifikovány sodné adukty $[M+Na]^+$ a v záporném módu deprotonované molekuly galaktolipidů $[M-H]^-$. Pro charakterizaci MGDG a DGDG byla použita kolizemi indukovaná fragmentace (CID) v režimu závislého skenu (nastavené parametry viz příloha).

Fragmentační spektra sodných aduktů MGDG a DGDG obsahovala ve shodě s publikacemi [27, 40, 45] fragmenty odpovídající odštěpení jednotlivých mastných kyselin z polohy *sn*-1 respektive *sn*-2 na glycerolu. Tyto fragmenty byly nejintenzivnější ve spektru. Ve shodě s publikací [45] byl fragment s vyšší intenzitou přiřazen odštěpení mastné kyseliny z polohy *sn*-1. Další fragmenty s nižší intenzitou odpovídaly odštěpení galaktosy $[M+Na-162]^+$ a odštěpení obou mastných kyselin, tedy $[C_9H_{16}O_6Na]^+$ u MGDG a $[C_{15}H_{26}O_{11}Na]^+$ u DGDG [27].

Fragmentační spektra MGDG a DGDG v záporném módu ESI obsahovala fragmenty odpovídající odštěpení mastných kyselin vázaných v poloze *sn*-1 respektive *sn*-2 na glycerolu (neutrální ztráta kyseliny, nebo odpovídajícího ketenu) a fragmenty odpovídající karboxylátovým iontům mastných kyselin $[R_xCOO]^-$ [35, 45].

Standardy oxidovaných MGDG a DGDG nebyly komerčně vyráběny. Jejich hmotnostní spektra byla v této práci porovnávána s neoxidovanými MGDG a DGDG přítomnými v analyzovaných vzorcích izolovaných rostlinných extraktů. Stejně jako neoxidované MGDG a DGDG poskytovaly i oxidované galaktolipidy sodné adukty $[M+Na]^+$ v kladném módu a deprotonované molekuly $[M-H]^-$ v záporném módu ESI. Fragmentační hmotnostní spektra byla u většiny analytů velmi podobná (shodné majoritní fragmenty). Ve fragmentačních spektrech sodných aduktů oxidovaných MGDG byly v této práci pozorovány fragmenty s nízkou intenzitou odpovídající

sodnému aduktu oxidované mastné kyseliny. Například u MGDG obsahujících oxidované osmnácti uhlíkaté kyseliny ($C_{18}H_{28}O_3$, $C_{18}H_{30}O_3$ nebo $C_{18}H_{30}O_4$) byly ve fragmentačních spektrech sodných aduktů identifikovány fragmenty o m/z 315,2; 317,2 a 333,2. Na **obr. 5A** je uvedeno fragmentační hmotnostní spektrum oxidovaného MGDG z huseníčku (m/z 811,4966 $[M+Na]^+$, $C_{45}H_{72}O_{11}Na$, $t_R = 40,03$ min). Ve fragmentačním spektru je viditelný fragment odpovídající ztrátě galaktosy (m/z 649,4431, $C_{39}H_{62}O_6Na$, $\Delta = -1,2$ ppm), fragment odpovídající ztrátě oxidované mastné kyseliny vázané v poloze *sn*-1 na glycerolu (m/z 519,2919, $C_{27}H_{44}O_8Na$, $\Delta = -1,8$ ppm), fragment odpovídající ztrátě neoxidované mastné kyseliny vázané v poloze *sn*-2 na glycerolu (m/z 533,2712, $C_{27}H_{42}O_9Na$, $\Delta = -1,7$ ppm) a fragment odpovídající sodnému aduktu oxidované mastné kyseliny (m/z 315,1925, $C_{18}H_{28}O_3Na$, $\Delta = -1,9$ ppm). Fragment odpovídající sodnému aduktu neoxidované mastné kyseliny nebyl ve spektru pozorován.

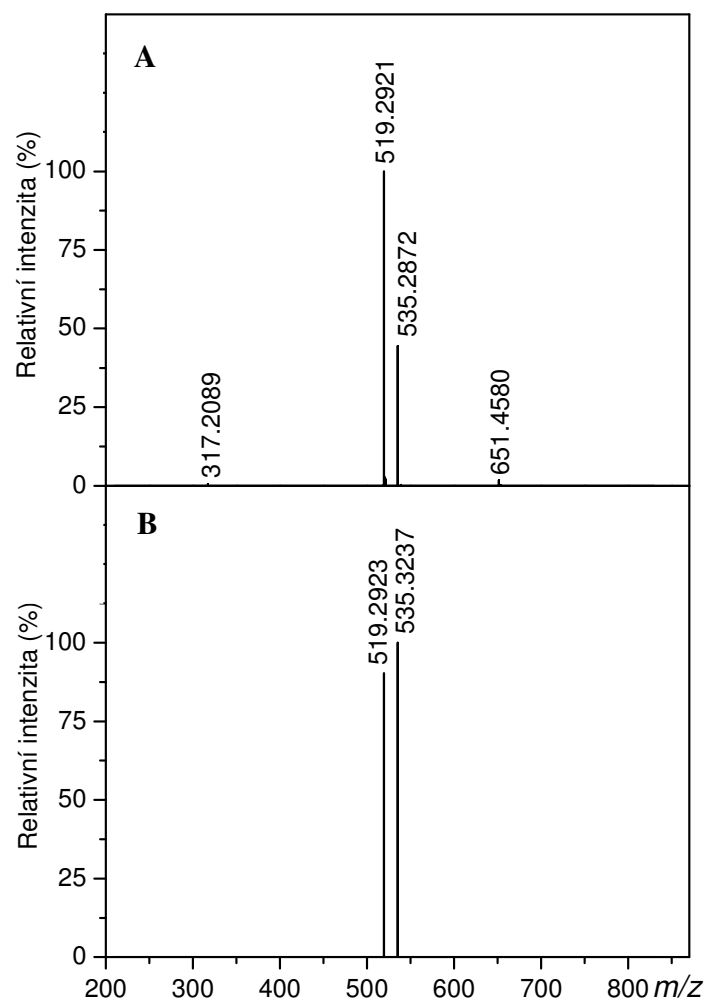


Obr. 5: ESI-MS/MS spektrum (CID) oxidovaného MGDG z huseníčku s obsahem mastných kyselin $C_{18}H_{28}O_3/18:3$ (*sn*-1/*sn*-2 pozice na glycerolu), $t_R = 40,03$ min. (A) Pozitivní ionizace: m/z 811,4966 ($[M+Na]^+$, $C_{45}H_{72}O_{11}Na$); (B) Negativní ionizace: m/z 787,5013 ($[M-H]^-$, $C_{45}H_{71}O_{11}$). Experimentální podmínky jsou uvedeny v příloze.

Na **obr. 5B** je uvedeno fragmentační spektrum stejného analytu (m/z 787,5013 $[M-H]^-$, $C_{45}H_{71}O_{11}$) naměřené v záporném módu ESI. Ve fragmentačním spektru je viditelný karboxylátový iont oxidované mastné kyseliny $[R_1COO]^-$ (m/z 291,1959, $C_{18}H_{27}O_3$, $\Delta = -2,2$ ppm), karboxylátový iont neoxidované mastné kyseliny $[R_2COO]^-$ (m/z 277,2167, $C_{18}H_{29}O_2$, $\Delta = -2,2$ ppm) a fragment odpovídající ztrátě neoxidované mastné kyseliny (m/z 509,2743, $C_{27}H_{41}O_9$, $\Delta = -2,5$ ppm), respektive ztrátě ketenu (m/z 527,2849, $C_{27}H_{43}O_{10}$, $\Delta = -2,5$ ppm).

Fragmentační hmotnostní spektra oxidovaných DGDG byla velmi podobná fragmentačním hmotnostním spektrům neoxidovaných DGDG. Vzhledem k nízkému zastoupení oxidovaných DGDG ve zkoumaných vzorcích nebylo možné vytvořit jejich detailnější porovnání.

Vzhledem k velké podobnosti fragmentačních hmotnostních spekter většiny oxidovaných i neoxidovaných galaktolipidů nebylo možné provést jejich správnou interpretaci s použitím hmotnostního spektrometru s nízkým rozlišením. Vezmeme-li v úvahu např. galaktolipid, který bude ve své struktuře obsahovat jednu oxidovanou mastnou kyselinu a stejný galaktolipid, který bude místo oxidované mastné kyseliny obsahovat neoxidovanou mastnou kyselinu s delším řetězcem (jeden uhlíkový atom navíc) a nižší nenasyceností (o jednu dvojnou vazbu méně), tak m/z prekurzorového iontu těchto galaktolipidů se bude lišit pouze o 36 mDa a nutnost použití vysokého rozlišení je tedy zřejmá. Reálným příkladem mohou být MGDG ze vzorku huseníčku, ve kterém byly identifikovány dva analyty o m/z 813,5 ($[M+Na]^+$, $t_{R1} = 38,45$ min, $t_{R2} = 65,45$ min). Při měření na hmotnostním spektrometru s nízkým rozlišením, nebylo možné rozlišit, zda tyto analyty obsahují různé mastné kyseliny (neutrální ztráty odpovídající odštěpení jednotlivých mastných kyselin byly shodné) a z jakého důvodu se tedy liší jejich eluční chování. Při použití hmotnostního spektrometru s vysokým rozlišením bylo zjištěno, že první z analytů (m/z 813,5132 $[M+Na]^+$, $C_{45}H_{74}O_{11}Na$, $\Delta = 0,7$ ppm) je oxidovaný a obsahuje mastné kyseliny $C_{18}H_{30}O_3/18:3$ (poloha *sn-1/sn-2* na glycerolu) a druhý z analytů (m/z 813,5502 $[M+Na]^+$, $C_{46}H_{78}O_{10}Na$, $\Delta = 1,7$ ppm) je neoxidovaný a obsahuje mastné kyseliny 18:3/19:2. Fragmentační hmotnostní spektra obou analytů jsou uvedena na **obr. 6**.



Obr. 6: ESI-MS/MS spektrum (CID) MGDG z huseníčku. **(A)** Oxidovaný MGDG o m/z 813,5132 ($[M+Na]^+$, $C_{18}H_{30}O_3/18:3$, $t_R = 38,45$ min). **(B)** Neoxidovaný MGDG o m/z 813,5502 ($[M+Na]^+$, $18:3/19:2$, $t_R = 65,45$ min). Experimentální podmínky jsou uvedeny v příloze.

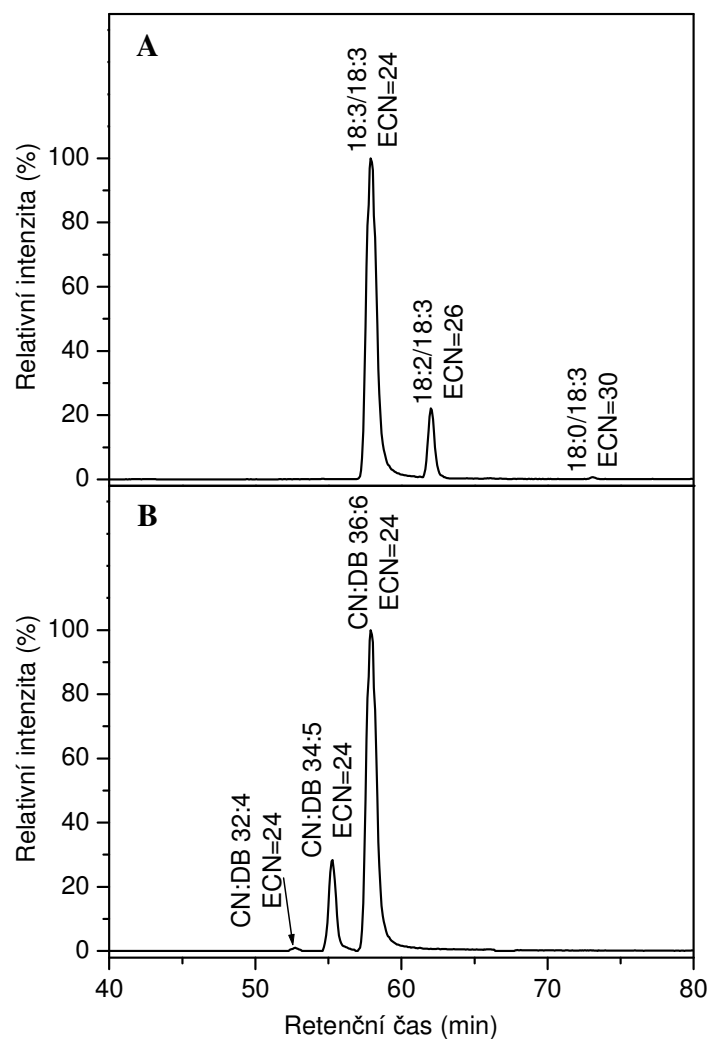
V analyzovaných vzorcích galaktolipidů z huseníčku a meduňky bylo identifikováno několik analytů se stejnou nominální hmotností, avšak různými mastnými kyselinami vázanými na glycerolu (viz příloha Tabulka S1 a Tabulka S2).

4.2 Retenční chování galaktolipidů

S využitím optimalizovaných gradientů byla pozorována eluce většiny neoxidovaných MGDG a DGDG podle vzrůstající hodnoty ECN (viz příloha Tabulky S1-S4). Retence MGDG a DGDG se zvyšovala u analytů obsahujících mastné kyseliny s delším řetězcem a nižší nenasyceností (viz **obr. 7A**). Zároveň však bylo pozorováno,

že ve skupině neoxidovaných MGDG a DGDG se shodnou hodnotou ECN dochází k vyšší retenci analytů obsahujících polynenasycené mastné kyseliny (viz **obr. 7B**).

U neoxidovaných MGDG bylo pozorováno několik výjimek v elučním pořadí podle ECN (viz příloha Tabulka S1, Tabulka S2). Například MGDG z huseníčku ($t_R = 54,62$ min, ECN = 23) eluoval ve skupině MGDG ($t_R = 52,74 - 57,90$ min) s hodnotou ECN 24. Tento jev může být způsoben přítomností rozvětvených mastných kyselin ve struktuře galaktolipidu [31].



Obr. 7: Rekonstruovaný chromatogram MGDG z huseníčku. **(A)** MGDG o m/z 797,5173 ($[M+Na]^+$, 18:3/18:3, ECN = 24), m/z 799,5336 ($[M+Na]^+$, 18:2/18:3, ECN = 26) a m/z 803,5655 ($[M+Na]^+$, 18:0/18:3, ECN = 30). **(B)** MGDG o m/z 745,4855 ($[M+Na]^+$, 16:1/16:3 a 18:3/14:1), CN:DB 32:4, ECN = 24, m/z 771,5023 ($[M+Na]^+$, 18:3/16:2 a 18:2/16:3), CN:DB 34:5, ECN = 24 a m/z 797,5173 ($[M+Na]^+$, 18:3/18:3), CN:DB 36:6, ECN = 24. Experimentální podmínky jsou uvedeny v příloze.

Navzdory ojedinělým výjimkám v elučním pořadí neoxidovaných galaktolipidů může být výpočet ECN významnou pomocí, zvláště pokud jsou dostupná hmotnostní spektra pouze s nízkým rozlišením. V případě mylné identifikace oxidovaných a neoxidovaných galaktolipidů odhalí výpočet ECN převažující nesrovnalosti v elučním pořadí.

4.3 Galaktolipidy z huseníčku a meduňky

S využitím optimalizovaných podmínek bylo v huseníčku identifikováno 55 MGDG a 18 DGDG. V případě meduňky bylo identifikováno 25 MGDG a 13 DGDG. Celková (relativní) plocha píku oxidovaných galaktolipidů odpovídala 17,1 % MGDG; 5,0 % DGDG ve vzorku huseníčku a 4,4 % MGDG; 1,6 % DGDG ve vzorku meduňky. Naměřená data jsou ve shodě se zařazením huseníčku mezi 16:3 rostliny a meduňky mezi 18:3 rostliny [10]. Největší relativní plocha píku 38,86 % odpovídala neoxidovanému MGDG s mastnými kyselinami 18:3/16:3 (poloha *sn*-1/*sn*-2 na glycerolu) ve vzorku huseníčku, zatímco největší relativní plocha píku 61,38 % odpovídala neoxidovanému MGDG s mastnými kyselinami 18:3/18:3 (poloha *sn*-1/*sn*-2 na glycerolu) ve vzorku meduňky.

Huseníček (*A. thaliana*) je používán jako modelová rostlina. Naměřená data lze tedy porovnávat s již publikovanými výsledky. V rámci této práce bylo nově identifikováno 10 neoxidovaných MGDG (viz příloha Tabulka S1), u kterých převažuje přítomnost polynenasycených mastných kyselin (MGDG 18:4/16:3; MGDG 16:4/18:3) a mastných kyselin s lichým počtem atomů uhlíku (MGDG 17:3/18:3; MGDG 18:3/19:2). Celková (relativní) plocha píku nově identifikovaných MGDG byla 1,7 %. V případě neoxidovaných DGDG byl nově identifikován jeden galaktolipid (DGDG 18:3/14:0). Při porovnávání obsahu mastných kyselin v molekulách MGDG a DGDG bylo zjištěno několik případů galaktolipidů publikovaných jako neoxidované, které byly zároveň měřeny pouze na hmotnostním spektrometru s nízkým rozlišením [1, 27, 28], a které nebyly v této práci identifikovány, avšak molekuly se stejnou nominální hmotností byly identifikovány jako oxidované galaktolipidy. Příkladem mohou být MGDG o *m/z* 829 a 827 $[M+Na]^+$, které byly v publikacích [1, 27, 28] identifikovány jako neoxidované; MGDG o *m/z* 829 ($C_{47}H_{82}O_{10}$, CN:DB 38:4) a MGDG o *m/z* 827 ($C_{47}H_{80}O_{10}$, CN:DB 38:5). V rámci této práce byly uvedené MGDG identifikovány jako oxidované; MGDG

o m/z 829 ($C_{45}H_{74}O_{12}$, $C_{18}H_{30}O_4/18:3$) a MGDG o m/z 827 ($C_{45}H_{72}O_{12}$, $C_{18}H_{28}O_4/18:3$). Shodná interpretace uvedených MGDG, tedy jejich identifikace jako oxidované MGDG s využitím vysokého rozlišení, byla publikována v novější studii [22].

V případě oxidovaných galaktolipidů nebyla v rámci této práce detailně studována jejich struktura. Elementární složení několika oxidovaných galaktolipidů bylo shodné s již publikovanými výsledky. Například MGDG o m/z 797,4447 ($[M+Na]^+$, $t_R = 10,14$ min) s obsahem mastných kyselin $C_{18}H_{28}O_3/C_{16}H_{24}O_3$ by mohl odpovídat arabidopsidu A s obsahem mastných kyselin oPDA/dn-oPDA ($= C_{18}H_{28}O_3/C_{16}H_{24}O_3$) a MGDG o m/z 825,4752 ($[M+Na]^+$, $t_R = 14,52$ min) s obsahem mastných kyselin $C_{18}H_{28}O_3/C_{18}H_{28}O_3$ by mohl odpovídat arabidopsidu B s obsahem mastných kyselin oPDA/oPDA ($= C_{18}H_{28}O_3/C_{18}H_{28}O_3$) [46].

Složení MGDG a DGDG ve vzorku meduňky lékařské bylo poprvé studováno v této práci. Oproti vzorku huseníčku bylo v meduňce identifikováno méně galaktolipidů. Nejzajímavější je přítomnost dvou oxidovaných MGDG o m/z 783,4660 ($[M+Na]^+$, $t_R = 37,89$ min), respektive o m/z 811,4963 ($[M+Na]^+$, $t_R = 39,93$ min), která naznačuje, že biosyntéza galaktolipidů s (dn)oPDA probíhá i v dalších rostlinách. Dosud byly galaktolipidy s obsahem oPDA a dn-oPDA identifikovány pouze v huseníčku (*A. thaliana* a *A. arenosa*) [42].

Novější studie potvrzuje, že galaktolipidy s obsahem (dn)oPDA se hojněji vyskytují zejména v čeledi brukvovité (*Brassicaceae*), do níž se řadí huseníček a výskyt těchto galaktolipidů u dalších druhů rostlin je spíše ojedinělý [47]. Fylogenetická souvislost zatím nebyla objasněna.

5 Závěr

V rámci této práce byly vyvinuty RP-HPLC/ESI-MS² metody pro detailní charakterizaci oxidovaných i neoxidovaných MGDG a DGDG. Eluční chování galaktolipidů bylo hodnoceno ve vztahu k ECN, a bylo zjištěno, že neoxidované MGDG a DGDG eluují ve shodě s ECN. Zároveň byla nalezena velká podobnost fragmentačních hmotnostních spekter (CID) oxidovaných a neoxidovaných galaktolipidů, pro jejichž správnou identifikaci je nutné měření hmotnostních spekter za podmínek vysokého rozlišení.

Optimalizované metody byly aplikovány na vzorky MGDG a DGDG z huseníčku rolního a meduňky lékařské. V huseníčku bylo identifikováno 55 MGDG a 18 DGDG. V meduňce bylo identifikováno 25 MGDG a 13 DGDG. Relativně velký podíl, zvláště s přihlédnutím k tomu, že rostliny nebyly před izolací záměrně stresovány, tvořily oxidované galaktolipidy. Celková (relativní) plocha píku oxidovaných galaktolipidů odpovídala 17,1 % MGDG; 5,0 % DGDG ve vzorku huseníčku a 4,4 % MGDG; 1,6 % DGDG ve vzorku meduňky. Jeden DGDG a deset MGDG bylo v rámci této práce identifikováno poprvé.

6 Seznam bibliografických citací

- 1 Welti, R; Wang, X.: Lipid species profiling: a high-throughput approach to identify lipid compositional changes and determine the function of genes involved in lipid metabolism and signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 337-344 (2004).
- 2 Hölzl, G.; Dörmann, P.: Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. *Progress in Lipid Research* 46, 225-243 (2007).
- 3 <<http://www.lipidhome.co.uk/lipids/complex/mg-dgdg/index.htm>> [cit. 14. 4. 2018]
- 4 Mosblech, A.; Feussner, I.; Heilmann, I.: Oxylipins: Structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. *Plant Physiology and Biochemistry* 47, 511-517 (2009).
- 5 Maeda, N.; Kokai, Y.; Ohtani, S.; Hada, T.; Yoshida, H.; Mizushima, Y.: Inhibitory effects of preventive and curative orally administered spinach glycolipid fraction on the tumor growth of sarcoma and colon in mouse graft models. *Food Chemistry* 112, 205-210 (2009).
- 6 Reshef, V.; Mizrahi, E.; Maretzki, T.; Silberstein, C.; Loya, S.; Hizi, A.; Carmeli, S.: New acylated sulfoglycolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. *Journal of Natural Products* 60, 1251-1260 (1997).
- 7 Larsen, E.; Kharazmi, A.; Christensen, L.P.; Christensen, S.B.: An Antiinflammatory Galactolipids from Rose Hip (*Rosa canina*) that Inhibits Chemotaxis of Human Peripheral Blood Neutrophils in Vitro. *Journal of Natural Products* 66, 994-995 (2003).
- 8 Fahy, E.; Subramaniam, S.; Brown, H.A.; Glass, Ch.K.; Merrill Jr., A.H.; Murphy, R.C.; Raetz, Ch.R.H.; Russell, D.W.; Seyama, Y.; Shaw, W.; Shimizu, T.; Spener, F.; van Meer, G.; van Nieuwenhze, M.S.; White, S.H.; Witztum, J.L.; Dennis, E.A.: A comprehensive classification system for lipids. *Journal of Lipid Research* 46, 839-861 (2005).
- 9 Carter, H.E.; McCluer, R.H.; Slifer, E.D.: Lipids of wheat flour. I. Characterisation of Galactosylglycerol Components. *Journal of the American Chemical Society* 78, 3735-3738 (1956).
- 10 Mongrand, S.; Bessoule, J.J.; Cabantous, F.; Cassagne, C.: The C_{16:3}/C_{18:3} Fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. *Phytochemistry* 49:4, 1049-1064 (1998).
- 11 Maréchal, E.; Block, M.A.; Dorne, A.-J.; Douce, R.; Joyard, J.: Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. *Physiologia Plantarum* 100, 65-77 (1997).
- 12 Heemsherk, J.W.M.; Storz, T.; Schmidt, R.R.; Heinz, E.: Biosynthesis of Digalactosyldiacylglycerol in Plastids from 16:3 and 18:3 Plants, *Plant Physiology* 93, 1286-1294 (1990).
- 13 Heinz, E.; Roughan, P.G.: Similarities and Differences in Lipid Metabolism of Chloroplasts Isolated from 18:3 and 16:3 Plants. *Plant Physiology* 72, 273-279 (1983).

- 14 Browse, J.; Warwick, N.; Somerville, R.; Slack, R.: Fluxes through the prokaryotic and eukarytic pathways of lipid synthesis in the '16:3' plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical Journal* 235, 25-31 (1986).
- 15 Dörmann, P.: *The structure and function of plastids*. Netherlands Springer 2006, 335-353.
- 16 Wang, S.Y.; Lin, H.-S.: Effect of plant growth temperature on membrane lipids in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae* 108, 35-42 (2006).
- 17 Andreou, A.; Brodhun, F.; Feussner, I.: Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. *Progress in Lipid Research* 48, 148-170 (2009).
- 18 Yamauchi, R.; Kojima, M.; Kato, K.; Ueno, Y.: Autoxidation Products of Polyunsaturated Galactolipids. *Agricultural and Biological Chemistry* 47:11, 2625-2630 (1983).
- 19 Howe, G.A.; Schilmiller, A.L.: Oxylipin metabolism in response to stress. *Current Opinion in Plant Biology* 5, 230-236 (2002).
- 20 Okazaki, Y.; Saito, K.: Roles of lipids as signaling molecules and mitigators during stress response in plants. *The Plant Journal* 79, 584-596 (2014).
- 21 Weber, H.; Vick, B.A.; Farmer, E.E.: Dinor-oxo-phytodienoic acid: A new hexadecanoid signal in the jasmonate family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:19, 10473-10478 (1997).
- 22 Vu, H.S.; Roston, R.; Shiva, S.; Hur, M.; Wurtele, E.S.; Wang, X.; Shah, J.; Welti, R.: Modification of membrane lipids in response to wounding of *Arabidopsis thaliana* leaves. *Plant Signaling & Behavior* 10:9, e1056422 (2015).
- 23 Hisamatsu, Y.; Goto, N.; Hasegawa, K.; Shigemori, H.: Arabidopsides A and B, two new oxylipins from *Arabidopsis thaliana*. *Tetrahedron Letters* 44, 5553-5556 (2003).
- 24 Hisamatsu, Y.; Goto, N.; Sekiguchi, M.; Hasegawa, K.; Shigemori, H.: Oxylipins Arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Natural Products* 68, 600-603 (2005).
- 25 Andersson, M.X.; Hamberg, M.; Kourtchenko, O.; Brunnström, Å.; McPhail, K.L.; Gerwick, W.H.; Göbel, C.; Feussner, I.; Ellerström, M.: Oxylipin Profiling of the Hypersensitive Response in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 281:42, 31528-31537 (2006).
- 26 Kourtchenko, O.; Andersson, M.X.; Hamberg, M.; Brunnström, Å.; Göbel, C.; McPhail, K.L.; Gerwick, W.H.; Feussner, I.; Ellerström, M.: Oxo-Phytodienoic Acid-Containing Galactolipids in Arabidopsis: Jasmonate Signaling Dependence. *Plant Physiology* 145, 1658-1669 (2007).
- 27 Welti, R.; Wang, X.; Williams, T.D.: Electrospray ionization tandem mass spectrometry scan modes for plant chloroplast lipids. *Analytical Biochemistry* 314, 149-152 (2003).
- 28 Devaiah, S.P.; Roth, M.R.; Baughman, E.; Li, M.; Tamura, P.; Jeannotte, R.; Welti, R.; Wang, X.: Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type Arabidopsis and phospholipase Dα1 knockout mutant. *Phytochemistry* 67, 1907-1924 (2006).
- 29 Buseman, M.Ch.; Tamura, P.; Sparks, A.A.; Baughman, E.J.; Maatta, S.; Zhao, J.; Roth, M.R.; Esch, S.W.; Shah, J.; Williams, T.D.; Welti, R.: Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor oxophytodienoic acid in Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* 142, 28-39 (2006).

- 30 Napolitano, A.; Carbone, V.; Saggese, P.; Takagaki, K.; Pizza, C.: Novel galactolipids from the leaves of *Ipomoea batatas* L.: Characterization by liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55, 10289-10297 (2007).
- 31 Ibrahim, A.; Schütz, A.-L.; Galano, J.-M.; Herrfurth, C.; Feussner, K.; Durand, T.; Brodhun, F.; Feussner, I.: The alfabet of galactolipids in *Arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science* 2, doi: 10.3389/fpls.2011.00095 (2011).
- 32 Li, H.; Yan, X.; Xu, J.; Zhou, C.: Precise identification of photosynthetic glycerolipids in microalga *Tetraselmis chuii* by UHPLC-ESI-Q-TOF-MS. *Science in China Series C Life Sciences* 51, 1101-1107 (2008).
- 33 Yao, H.; Shi, Y.; Gao, R.; Zhang, G.; Zhang, R.; Zheng, C.; Xu, B.: Isolation of lipids from photosystem I complex and its characterization with high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* 837, 101-107 (2006).
- 34 Glauser, G.; Grata, E.; Rudaz, S.; Wolfender, J.-L.: High-resolution profiling of oxylipin-containing galactolipids in *Arabidopsis* extracts by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 22, 3154-3160 (2008).
- 35 Gil, J. H.; Hong, J.; Choe, J.Ch.; Kim, Y.H.: Analysis of Fatty acyl groups of Diacyl Galactolipid Molecular Species by HPLC/ESI-MS with In-source Fragmentation. *Bulletin of Korean Chemical Society* 24, 1163-1168 (2003).
- 36 Christie, W.W.: *Lipid Analysis (Isolation, Separation, Identification and structural analysis of lipids)*, 3. vydání. The Oily Press 2003, s. 146, s. 310.
- 37 Christie, W.W.: *Advances in Lipid Methology – Four*, The Oily Press 1997, s. 209.
- 38 Bergquist, M.H.J.; Kaufmann, P.: Analysis of cereal digalactosyldiacylglycerol molecular species by high-performance liquid chromatography. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73, 211-217 (1996).
- 39 Deschamps, F.S.; Gaudin, K.; Baillet, A.; Chaminade, P.: Wheat digalactosyldiacylglycerol molecular species profiling using porous graphitic carbon stationary phase. *Journal of Separation Science* 27, 1313-1322 (2004).
- 40 Xu, J.; Chen, D.; Yan, X.; Chen, J.; Zhou, C.: Global characterisation of the photosynthetic glycerolipids from marine diatom *Stephanodiscus* sp. by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization-quadrupole-time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 663, 60-68 (2010).
- 41 Stelmach, B.A.; Müller, A.; Hennig, P.; Gebhardt, S.; Schubert-Zsilavecz, M.; Weiler, E.W.: A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl) monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 12832-12838 (2001).

- 42 Böttcher, Ch.; Weiler, E.W.: cyclo-Oxylipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. *Planta* 226, 629-637 (2007).
- 43 Pacetti, D.; Boselli, E.; Lucci, P.; Frega, N.G.: Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. *Journal of Chromatography A* 1150, 241-251 (2007).
- 44 He, H; Rodgers, R.P.; Marshall A.G., Hsu Ch.S.: Algae polar lipids characterized by online liquid chromatography coupled with hybrid linear quadrupole ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Energy Fuels* 25, 4470-4475 (2011).
- 45 Guella, G.; Frassanito, R.; Mancini, I.: A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communication in Mass Spectrometry* 17, 1982-1994 (2003).
- 46 Göbel, C.; Feussner, I.: Methods for the analysis of oxylipins in plants. *Phytochemistry* 70, 1485-1503 (2009).
- 47 Nilsson, A.K.; Johansson, O.N.; Fahlberg, P.; Kommuri, M.; Töpel, M.; Bodin, L.J.; Sikora, P.; Modarres, M.; Ekengren, S.; Nguyen, Ch.T.; Farmer, E.E.; Olsson, O.; Ellerström, M.; Andersson, M.X.: Acylated monogalactosyl diacylglycerol: prevalence in the plant kingdom and identification of an enzyme catalyzing galactolipid head group acylation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 84, 1152-1166 (2015).

7 Příloha

Analysis of plant galactolipids by reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with accurate mass measurement.

Zábranská Marie, Vrkoslav Vladimír, Sobotníková Jana, Cvačka Josef.

Chemistry and Physics of Lipids 165, 601-607 (2012).



Analysis of plant galactolipids by reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with accurate mass measurement

Marie Zábranská^{a,b}, Vladimír Vrkoslav^a, Jana Sobotníková^b, Josef Cvačka^{a,*}

^a Institute of Organic Chemistry and Biochemistry, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Flemingovo nám. 2, CZ-166 10 Prague 6, Czech Republic

^b Department of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Charles University in Prague, Hlavova 2030/8, CZ-128 43 Prague 2, Czech Republic

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 December 2011

Received in revised form 5 March 2012

Accepted 7 March 2012

Available online 19 March 2012

Keywords:

Accurate mass measurement

DGDG

Equivalent carbon number

MGDG

RP-HPLC/MS

ABSTRACT

The composition of plant membrane lipids was investigated by reversed-phase high performance liquid chromatography mass spectrometry with accurate mass measurement. The data dependent methods for the analysis of monogalactosyldiacylglycerols (MGDGs) and digalactosyldiacylglycerols (DGDGs) have been developed. The optimised chromatographic systems were based on a 2.0 mm i.d. Nucleosil C18 column with methanol/water (MGDGs) or acetonitrile/methanol/water (DGDGs) gradients. The galactolipids were ionised by electrospray operated in the positive ion mode and identified based on their MS/MS spectra. High resolution spectra with accurate masses were found to be essential for correct interpretation of the MS data. The elution order of non-oxidised MGDGs and DGDGs followed the equivalent carbon numbers. The methods were applied for detailed characterisation of the MGDGs and DGDGs in the leaves of *Arabidopsis thaliana* and *Melissa officinalis*.

© 2012 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Monogalactosyldiacylglycerols (MGDGs) and digalactosyldiacylglycerols (DGDGs) are glycolipids, which form the main part of the biological membranes in photosynthesising organisms, i.e., in plants, algae and some bacteria (see the structures in Fig. 1). They constitute about 80% of the total membrane lipids in plant leaves (Lee, 2000; Hölzl and Dörmann, 2007). The molecular species differ in fatty acids (FAs) linked to the *sn*-1 and *sn*-2 positions on the glycerol backbone. Plants are divided into two groups, namely '18:3 plants' and '16:3 plants' based on the predominant FAs in the *sn*-2 position of MGDGs (Heemskerk et al., 1990; Maréchal et al., 1997). The distribution of FAs in MGDGs and DGDGs is influenced by the environmental conditions, e.g., the temperature or phosphate deprivation (Dörmann, 2006). Galactolipids are indispensable components of photosynthesising complexes and they are also of interest owing to their anticancer, antiviral and anti-inflammatory activity (Maeda et al., 2009; Reshef et al., 1997; Larsen et al., 2003).

Unsaturated MGDGs and DGDGs can be oxidised by enzymatic processes or chemical oxidation (autooxidation). The predominant oxidised lipids (oxylipins) formed from linoleic and α -linolenic acid by enzymatic reactions are characterized by C-9 or C-13 positional isomers, whereas those formed by autooxidation are C-10 and

C-12 isomers (linoleic acid) or C-15 and C-16 isomers (α -linolenic acid). The biosynthesis of oxylipins is a highly dynamic process, which occurs during leaf senescence or as a reaction to wounding or pathogen attack (Mosblech et al., 2009; Yamauchi et al., 1983). Oxylipins have distinct functions and biological activities (Andreou et al., 2009). Those identified in the genus *Arabidopsis* (arabidopsides) were shown to contain 12-oxophytodienoic acid; oPDA; and/or dinor-oxophytodienoic acid; dn-oPDA (Hisamatsu et al., 2003, 2005; Andersson et al., 2006), but various other types of oxidised galactolipids containing hydroperoxy-, hydroxy-, oxo- and epoxy-FAs have also been described (Buseman et al., 2006; Mosblech et al., 2009; Göbel and Feussner, 2009; Ibrahim et al., 2011; Vu et al., 2012).

The composition of the galactolipids is analysed using the ESI-MS/MS lipid profiling approaches (Welti et al., 2003; Welti and Wang, 2004; Devaiah et al., 2006; Andersson et al., 2006; Buseman et al., 2006; Vu et al., 2012). The HPLC separation of MGDG and DGDG molecular species is usually achieved in reversed-phase mode on chemically bonded octadecyl stationary phases (Gil et al., 2003; Yao et al., 2006; Napolitano et al., 2007; Ibrahim et al., 2011). The mobile phases consist of methanol, acetonitrile and water, occasionally with the addition of ammonium formate/acetate. Recently, the use of ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) (Glauser et al., 2008; Li et al., 2008; Xu et al., 2010) and nano-scale HPLC (He et al., 2011) has been demonstrated. Nowadays, the (U)HPLC is often coupled to MS with utilizing electrospray ionization and quadrupole time-of-flight, triple quadrupole (Xu et al., 2010; Stelmach et al., 2001; Böttcher and Weiler, 2007) or

* Corresponding author. Tel.: +420 220 183 303; fax: +420 220 183 583.

E-mail address: cvaccka@uochb.cas.cz (J. Cvačka).

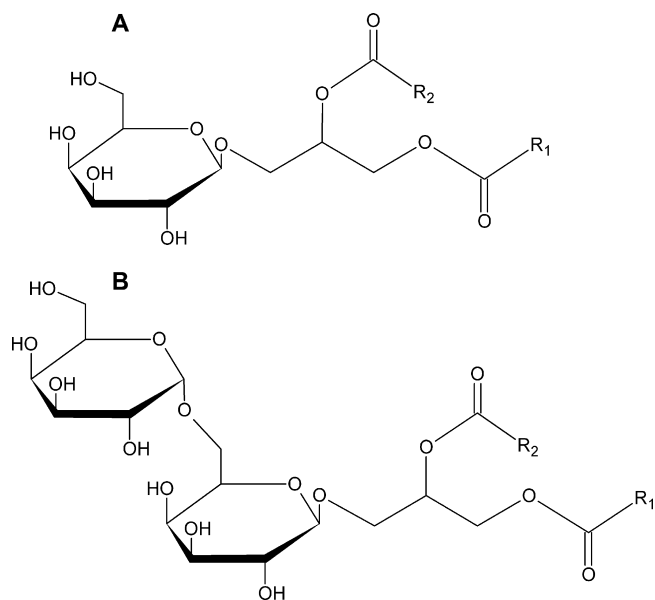


Fig. 1. The structures of the MGDGs (A) and DGDGs (B).

ion trap (Yao et al., 2006; Pacetti et al., 2007) mass spectrometers. The most recent publications describe also the use of Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (He et al., 2011; Vu et al., 2012). The galactolipids are detected either in positive or negative ion mode. The identification of the molecular species is based on the MS/MS spectra allowing characterization of FAs linked to glycerol backbone (Stelmach et al., 2001; Guella et al., 2003; Xu et al., 2010). The regiochemical distribution of FAs can be established based on the fragment ion intensities (Guella et al., 2003).

The plant lipidome is quite complex, which demands carefully optimized analytical methods for its thorough characterization. When focused on galactolipids, a large number of MGDG and DGDG molecular species both in non-oxidised and oxidised forms have to be described. Here, we report on HPLC/ESI-MS/MS methods carefully designed for separation and detection of lipids from two galactolipid classes – MGDGs and DGDGs. The methods allowed us a high number of non-oxidised and oxidised molecular species to be characterised in unstressed plants. Two plant species were used: *Arabidopsis thaliana* ('16:3 plant') and *Melissa officinalis* ('18:3 plant'). The use of accurate mass measurement was shown to be essential for distinguishing the mass spectra of the oxidised and non-oxidised species and thus for their correct interpretation. The elution order was found to be another useful tool for structural characterization of galactolipids, especially when a high-resolution spectrometer is not available.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The gradient-grade acetonitrile and methanol were obtained from LachNer (Neratovice, Czech Republic). The gradient-grade propane-2-ol was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The analytical-grade chloroform was distilled in glass and stabilised by 1% of ethanol (Penta, Chrudim, Czech Republic). 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT) was purchased from Fluka (Buchs, Switzerland) and primuline (dye content, 50%) from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA). The deionised water was manufactured by Milli Q system (Millipore, Milford, MA, USA). The reagent-grade potassium chloride and magnesium sulphate was from Lachema

(Brno, Czech Republic). The MGDGs and DGDGs from whole wheat flour were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA); no information about the molecular species composition was available. The standards of MGDG and DGDG with stearic acids in both *sn*-1 and *sn*-2 positions were purchased from Matreya (Pleasant Gap, PA, USA).

2.2. Plant material

Thale cress *A. thaliana* (WT, cv. Columbia) plants were cultivated from seeds at the Institute of Experimental Botany, ASCR, v.v.i. in Prague. The seeds were surface sterilised with 60% ethanol and 0.5% NaClO, rinsed with sterile water and transferred onto modified Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) supplemented with 3% sucrose and 0.8% agar, and the pH was adjusted to 5.8. The seedlings were cultivated at 23 °C with 16/8 h light/dark cycle at a light intensity of 7200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, in a growth cabinet (MLR-350, Sanyo Electric Co., Japan). After three weeks, the plants were moved onto fresh media and cultivated for another three weeks in the same conditions. Fresh lemon balm (*M. officinalis*) plants were purchased at a local market. The plants were not intentionally stressed to increase production of oxidised lipids.

2.3. Lipid extraction from leaves

The plant leaves (15 g) were cut off into an Erlenmeyer flask; propane-2-ol containing 0.01% of BHT (30 mL) was quickly added and the flask was heated in a water bath for 15 min at 75 °C. Afterwards, chloroform (15 mL) and water (6 mL) were added followed by a 1-h agitation. The extract was collected and the leaves were reextracted with chloroform:methanol (2:1, v/v; 20 mL) four times. The combined extract was washed with 1 M potassium chloride (10 mL) and deionised water (10 mL). Anhydrous magnesium sulphate (ca. 7 g) was added to remove the water residues. The extract was filtered through purified cotton wool in a glass column and concentrated on a rotary evaporator (40 °C, 170 mbar) to approximately one-third volume.

2.4. Thin-layer chromatography

The plant extracts were separated by TLC on glass plates (36 mm × 76 mm) coated with a 0.2 mm layer of silica gel 60 G (Merck, Darmstadt, Germany) with gypsum (12%). The mobile phase consisted of chloroform:methanol:water (80:18:2, v/v/v). The MGDGs and DGDGs were visualised under UV light after spraying the plates with a solution of primuline (0.05%) in methanol:water (8:2, v/v). The TLC zones corresponding to the MGDGs ($R_f = 0.69$) and DGDGs ($R_f = 0.40$) were scraped off the plates and extracted with chloroform:methanol (2:1, v/v). The solvent was finally evaporated under a nitrogen stream and the residues were dissolved in chloroform:methanol (2:1, v/v) at a concentration of 1 mg/mL and stored in a freezer (−20 °C). The samples were directly used for HPLC/ion trap-MS or diluted 40× for HPLC/orbitrap-MS.

2.5. High-performance liquid chromatography/mass spectrometry

The HPLC was performed on two instruments: 1/a system consisting of a Rheos Allegro gradient pump, an AS 3000 autosampler and an LCQ Fleet ion trap mass spectrometer and 2/a system consisting of a Rheos Allegro gradient pump, a CTC-Pal autosampler and an LTQ Orbitrap XL hybrid mass spectrometer. Both mass spectrometers were equipped with an IonMax electrospray ion source. All of the instruments were manufactured by Thermo Fischer Scientific (San Jose, CA, USA). A Nucleosil C18 stainless steel column (250 mm × 2 mm, 5 μm , Macherey-Nagel, Germany) with

a C18 precolumn (4 mm × 2 mm, Phenomenex, USA) was used. For each analysis, 5 µl of sample was injected. The flow rate of the mobile phase was 200 µl/min and the column temperature was 30 °C. The mobile phase for the MGDGs was mixed from water (A) and methanol (B). The linear gradient increased from 75% of B to 100% of B in 80 min, followed by 10 min at 100% of B. The mobile phase for the DGDGs was mixed from water (A), acetonitrile (B) and methanol (C) as follows: 35% of A, 65% of B (0 min); 80% of B and 20% of C (50 min); 100% of C (60 min); 100% of C (80 min).

The experimental parameters were the same for the both systems described above. The full scan electrospray mass spectra of positive ions were recorded in the m/z 400–1500 range. The ion source voltage, capillary voltage, tube lens voltage and capillary temperature was 4.3 kV, 87.5 V, 187 V and 315 °C, respectively, for the MGDGs and 5.5 kV, 30 V, 205 V and 330 °C, respectively, for the DGDGs. Nitrogen was used as the sheath/auxiliary gas (65 a.u./24 a.u. for the MGDGs and 30 a.u./35 a.u. for the DGDGs) and helium served as the collision gas. The MS/MS CID experiments were performed in the data dependent mode using an isolation width of 1.0 and normalised collision energy of 31.5%; dynamic exclusion with the repeat count, repeat duration and exclusion duration set to 3 s, 30 s and 120 s, respectively, was used. The samples were analysed in two steps; the first HPLC/MS/MS run was based on a non-targeted approach and served for finding a maximum number of molecular species. Subsequently, an inclusion parent mass list of MGDG or DGDG sodium adducts was built for the following (targeted) HPLC/MS/MS analysis. The accurate mass spectra were recorded with a resolving power of 15,000 and diisooctyl phthalate ion (m/z 413.2668, $[M+Na]^+$) lock mass.

The electrospray mass spectra of negative ions were recorded in the m/z 150–1500 range. The ion source voltage, capillary voltage, tube lens voltage and capillary temperature was 4.5 kV, –40.0 V, –125.6 V and 265 °C, respectively, for the MGDGs and 4.5 kV, –36.0 V, –125.0 V and 265 °C, respectively, for the DGDGs. Nitrogen was used as the sheath/auxiliary gas (20 a.u./25 a.u. for the MGDGs and 56 a.u./24 a.u. for the DGDGs) and helium served as the collision gas. The MS/MS CID experiments were performed in analogous manner as described for positive ion mode.

The data were processed in Xcalibur 2.0.7 (Thermo Fischer Scientific, USA).

3. Results and discussion

3.1. RP-HPLC separation of galactolipids

Two independent chromatographic methods were developed, one for MGDGs and the second one for DGDGs. The methods were based on reversed-phase systems allowing thorough separation based on the FA chains length and number of double bonds. Two independent methods were found to be more appropriate than a simultaneous separation of both galactolipid classes differing significantly in polarities. Taking into account high number on naturally occurring molecular species, gradient elutions were optimized using the standards of MGDGs and DGDGs from wheat flour. The optimum separation of the MGDG molecular species was achieved in a methanol/water gradient as specified above; all attempts to use acetonitrile/water systems resulted in poor chromatographic resolutions. The best chromatographic conditions for DGDGs were significantly different; acetonitrile was needed for successful elution of DGDGs. The optimum separation of DGDG molecular species was realized in an acetonitrile/methanol/water gradient (see Section 2.5). The representative chromatograms of MGDGs and DGDGs from *A. thaliana* and *M. officinalis* recorded under optimised conditions are given in Figs. 2 and 3, respectively.

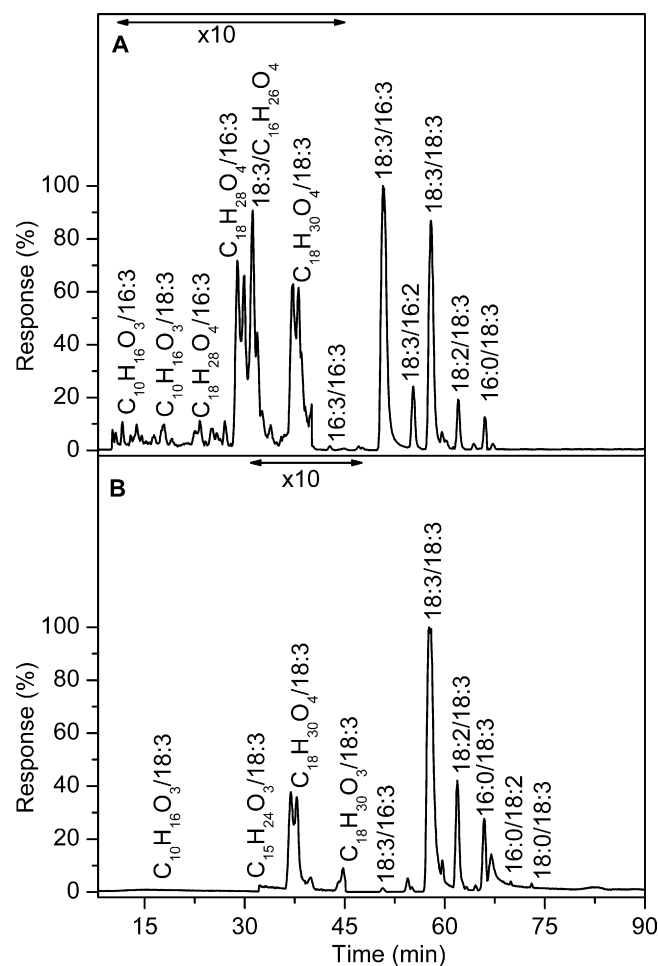


Fig. 2. The base peak chromatogram of the MGDGs from *A. thaliana*; the 10–40 min region is ten times enlarged (A). The base peak chromatogram of the MGDGs from *M. officinalis*, the 32–45 min region is ten times enlarged (B). RP-HPLC on a C18 column with a methanol/water gradient, positive ions generated by electrospray (see Section 2.5 for details).

3.2. Electrospray mass spectra of galactolipids

The electrospray mass spectra of non-oxidised MGDGs and DGDGs were studied in both ionisation modes using commercial standards. The MGDGs provided sodium adducts in the positive ion mode and deprotonated molecules in the negative ion mode. The CID MS/MS spectra of the sodium adducts were dominated by monogalactosylmonoacyl fragments corresponding to the elimination of FA either from the *sn*-1 or *sn*-2 position (Xu et al., 2010). Other fragments were significantly less abundant and included ions corresponding to the loss of dehydrated galactose ($[M+Na-162]^+$) or both FAs (m/z 243.1; $[C_9H_{16}O_6Na]^+$) (Welti et al., 2003). In addition, we found fragments consistent with a combine loss of dehydrated galactose and sodium salt of FA. These fragments were previously observed in in-source decay spectra of MGDGs (Guella et al., 2003). The most prominent fragments in the CID spectra of deprotonated molecules of MGDGs were FA carboxylate ions. Other fragments encompassed fragments originated after elimination of FAs from the $[M-H]^-$ either as neutral acid or corresponding ketene. The measured spectra were in an agreement with published data (Guella et al., 2003; Gil et al., 2003). DGDGs also provided sodium adducts in the positive ion mode and deprotonated molecules in the negative ion mode. The MS/MS spectra of the DGDG sodium adducts provided abundant digalactosylmonoacyl fragments corresponding to the elimination of FA either from

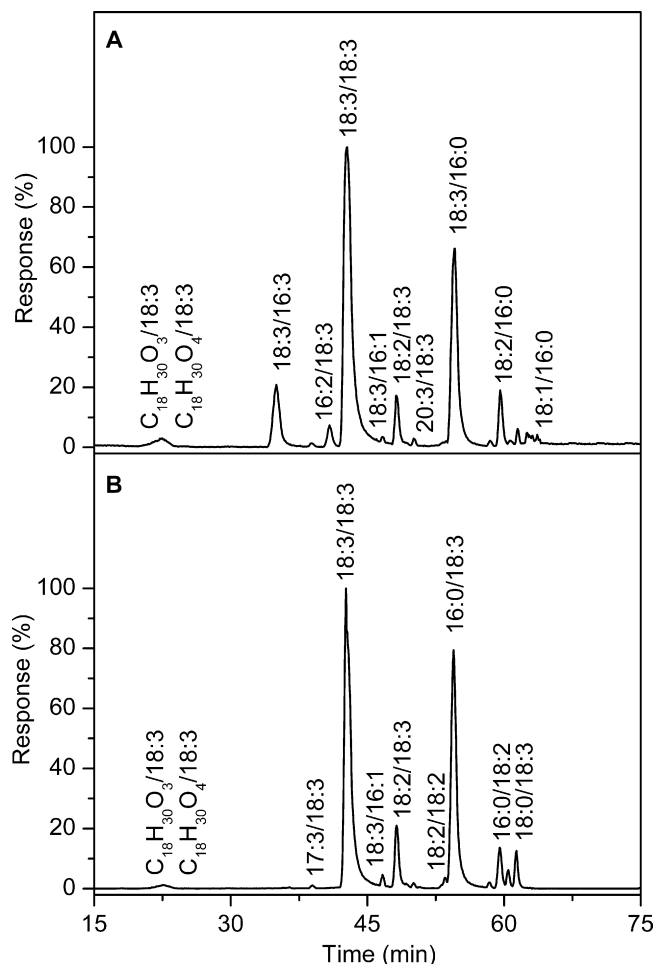


Fig. 3. The base peak chromatogram of the DGDGs from *A. thaliana* (A) and *M. officinalis* (B). RP-HPLC on a C18 column with an acetonitrile/methanol/water gradient, positive ions generated by electrospray (see Section 2.5 for details).

the *sn*-1 or *sn*-2 position. The $[M+Na]^+$ precursors as well as the digalactosylmonoacyl fragments eliminated dehydrated galactose (Guella et al., 2003; Xu et al., 2010); the precursors also eliminated both FAs (m/z 405.1; $[C_{15}H_{26}O_{11}Na]^+$) as described earlier (Xu et al., 2010). A low abundant sodium adduct of dehydrated digalactose was detected at m/z 347.1 ($[C_{12}H_{20}O_{10}Na]^+$). In the negative ion mode the CID MS/MS spectra showed fragments consistent with elimination of one or two FAs either as neutral acid or ketene. Less abundant FA carboxylate ions were present as well.

As standards of oxidised MGDGs and DGDGs were unavailable from commercial sources, their mass spectra were investigated in the galactolipid fractions isolated from plant material. The oxidised galactolipids provided sodium adducts or deprotonated molecules in the full scan spectra. The MS/MS spectra of the non-oxidised and oxidised species were quite similar in most cases, yielding the same type of main fragments (elimination of FAs from *sn*-1 and *sn*-2). Weak fragments specific for oxidised MGDGs were found in the MS/MS spectra of $[M+Na]^+$; the oxidised FAs in MGDGs formed very low abundant sodium adducts which have not been reported previously. Thus, for instance, the oxidised MGDGs containing singly and doubly oxidised C18 acids ($C_{18}H_{28}O_3$, $C_{18}H_{30}O_3$ or $C_{18}H_{30}O_4$) provided sodium adducts at m/z 315.2, 317.2 or 333.2, respectively. For example, the MS/MS spectrum of a singly oxidised MGDG from *A. thaliana* eluting in 40.03 min ($[M+Na]^+$ at m/z 811.4966, $C_{45}H_{72}O_{11}Na$) provided fragments corresponding to the loss of dehydrated galactose (m/z 649.4431, $C_{39}H_{62}O_6Na$, $\Delta = -1.2$ ppm), loss of FAs (m/z 519.2919, $C_{27}H_{44}O_8Na$, $\Delta = -1.8$ ppm and m/z

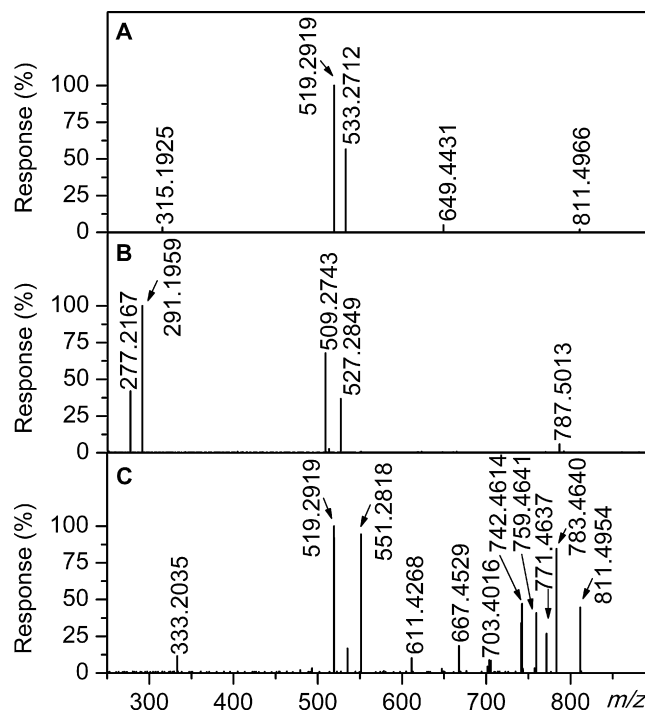


Fig. 4. The CID positive ion mode MS/MS spectrum of MGDG $C_{18}H_{28}O_3/18:3$ (m/z 811.4966 $[M+Na]^+$, $t_R = 40.03$ min) (A) and the CID negative ion mode MS/MS spectrum of the same compound (m/z 787.5013 $[M-H]^-$) (B) from *A. thaliana*. The CID positive ion mode MS/MS spectrum of an oxidised MGDG $C_{18}H_{30}O_4/18:3$ (m/z 829.5066 $[M+Na]^+$, $t_R = 38.08$ min) from *A. thaliana* (C).

533.2712, $C_{27}H_{42}O_9Na$, $\Delta = -1.7$ ppm) and sodium adduct of the oxidised FA at m/z 315.1925 ($C_{18}H_{28}O_3Na$, $\Delta = -1.9$ ppm), see Fig. 4A. Note that sodium adduct of the non-oxidised acid did not appear in the spectrum. The MS/MS spectrum of the same compound recorded in the negative ion mode is shown in Fig. 4B. Highly abundant carboxylate ions of both, non-oxidised and oxidised FA appeared at m/z 291.1959 ($C_{18}H_{27}O_3$, $\Delta = -2.2$ ppm) and 277.2167 ($C_{18}H_{29}O_2$, $\Delta = -2.2$ ppm). The elimination of FA from the deprotonated molecule was observed for the non-oxidised one (m/z 509.2743, $C_{27}H_{41}O_9$, $\Delta = -2.5$ ppm, loss of neutral acid; m/z 527.2849, $C_{27}H_{43}O_{10}$, $\Delta = -2.5$ ppm, loss of ketene). The main CID fragments of the oxidised DGDGs were analogous to non-oxidised ones. A very small number of oxidised DGDGs in our samples prevented us to make general conclusions about minor features in their mass spectra.

As the mass spectra of oxidised and non-oxidised galactolipids appeared almost the same, the low-resolution spectra did not allow us to distinguish between non-oxidised and oxidised species. The m/z values of the singly oxidised and non-oxidised precursors having one extra carbon and lacking a double bond differs by just 36 mDa, which makes masses of oxidised and non-oxidised lipids indistinguishable for low resolution mass spectrometers. Consequently, the oxidised species could be interpreted incorrectly as non-oxidised ones. For instance, the sample of *A. thaliana* MGDGs contained two compounds with the same nominal mass (m/z 813.5, $[M+Na]^+$), the first one eluting in 38.45 min and the second one in 65.45 min. The CID fragmentation provided similar spectra with ions corresponding to the elimination of FAs 294 u and 278 u (Fig. 5). The ion trap did not allow us to differentiate between them. However, the accurate masses recorded by orbitrap revealed that these peaks indeed represent different compounds. The first one was identified as an oxidised MGDG $C_{18}H_{30}O_3/18:3$ (m/z 813.5132 $[M+Na]^+$, $C_{45}H_{74}O_{11}Na$, $\Delta = 0.7$ ppm), whereas the second was a non-oxidised MGDG $18:3/19:2$ (m/z 813.5502 $[M+Na]^+$,

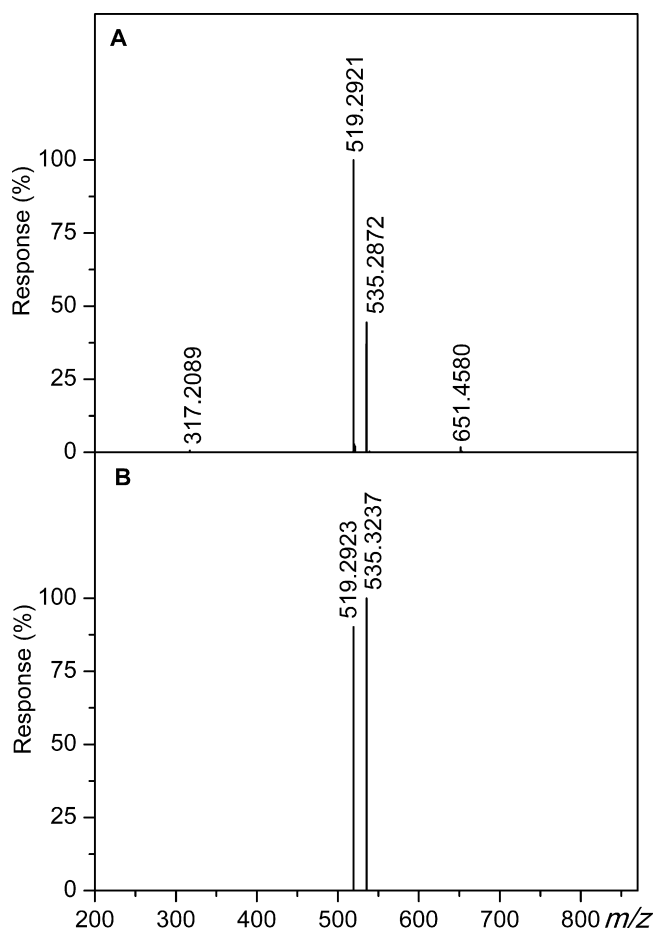


Fig. 5. The CID positive ion mode MS/MS spectrum of oxidised MGDG $C_{18}H_{30}O_3/18:3$ (m/z 813.5132 $[M+Na]^+$, $t_R = 38.45$ min) (A) and non-oxidised MGDG $18:3/19:2$ (m/z 813.5502 $[M+Na]^+$, $t_R = 65.45$ min) (B) from *A. thaliana*.

$C_{46}H_{78}O_{10}Na$, $\Delta = 1.7$ ppm). There were also other pairs of non-oxidised/oxidised MGDGs with the same nominal masses identified in *A. thaliana* and *M. officinalis* samples (see Tables S1 and S2). Therefore, the use of accurate mass measurement was found to be essential to avoid erroneous identifications. An oxidised MGDG eluting in 38.08 min ($[M+Na]^+$; m/z 829.5066, $C_{45}H_{74}O_{12}Na$, $\Delta = -0.8$ ppm) provided highly abundant fragments corresponding to the elimination of water and other species (e.g., C_2H_6O , C_3H_6O , C_4H_6O , $C_4H_7O_2$ or $C_4H_8O_2$), see Fig. 4C. A similar spectrum was previously reported in the literature (Napolitano et al., 2007) and interpreted as non-oxidised MGDG 20:1/18:3. The published spectrum contained an appreciably abundant fragment m/z 333.4 which has not been discussed. The analogous fragment in our accurate mass spectrum (m/z 333.2035; $C_{18}H_{30}O_4Na$, $\Delta = -0.4$ ppm) clearly indicated presence of an oxidised FA and the structure of this particular galactolipid was interpreted as MGDG $C_{18}H_{30}O_4/18:3$. We suppose that both spectra represented the same oxidised galactolipid. The structure was further confirmed from the negative ion mode spectrum showing carboxylate ions at m/z 277.2172 ($C_{18}H_{29}O_2$, $\Delta = -0.4$ ppm) and 309.2070 ($C_{18}H_{29}O_4$, $\Delta = -0.4$ ppm), see Fig. S1.

3.3. Retention behaviour of galactolipids

The elution order of the molecular species in the reversed-phase HPLC is well understood in case of neutral lipids. The retention of the FA methyl esters, wax esters, as well as triacylglycerols depends on the chain length and the number of double bonds (Christie,

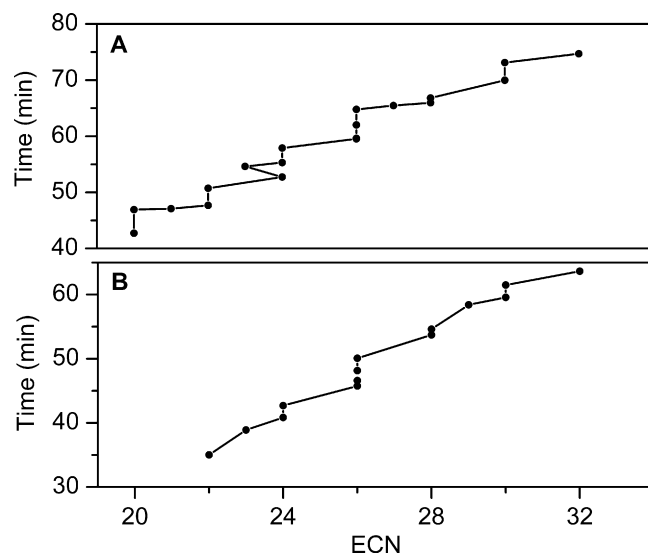


Fig. 6. The dependence of the retention time on the ECN values for MGDGs (A) and DGDGs (B) from *A. thaliana*.

2003). The elution order follows the equivalent carbon number (ECN) calculated as a number of carbon atoms in acyls minus two times the total number of double bonds. The ECN values are quite useful for the prediction of retention times and thus for confirmation of the lipid structure deduced from its mass spectrum. The elution order following ECN values is not that obvious in case of lipids with the polar headgroups, as various polar interactions might influence the retention mechanism. In case of galactolipids, the ECN retention order relationship has previously been demonstrated only for non-oxidised DGDGs (Bergqvist and Kaufmann, 1996; Deschamps et al., 2004).

In our separation systems optimized for MGDGs and DGDGs the groups of oxidised species eluted before the groups of non-oxidised ones, obviously due to their higher polarities. The elution order of the non-oxidised forms of DGDGs as well as MGDGs was found to follow the ECN values; within the groups with the same ECNs, the most unsaturated species were the most strongly retained in the column (Figs. 6 and 7). Only minor exceptions from the ECN order were found in MGDGs (Fig. 6, Tables S1 and S2). For instance, *A. thaliana* MGDG 17:3/18:3 (ECN = 23) eluted within the group of MGDGs with ECN = 24. As shown very recently, branched FAs occur in galactolipids (Ibrahim et al., 2011). Therefore, the occasional exceptions from the ECN order might be explained by branching in the fatty acyl chains. Despite minor exceptions, the ECN values can serve as a reliable tool for confirmation the galactolipid structures established from their mass spectra. The ECN values were particularly useful in case of low resolution MS, which provides almost the same spectra for oxidised and non-oxidised galactolipids; the logic of elution order helped us to distinguish between them. The elution order within the group of oxidised species was difficult to rationalise because of the structural variability of the compounds. The retention was affected by the nature of the oxygen-containing moieties, their number and location within the chains. General conclusions on the retention behaviour could not be made without detailed knowledge of their structures.

3.4. Galactolipids of *A. thaliana* and *M. officinalis*

The optimized HPLC/MS/MS methods were used for thorough characterization of MGDGs and DGDGs in the two model plants. The positive ionisation mode was used because of high sensitivity and reliable identification of both, non-oxidised and oxidised

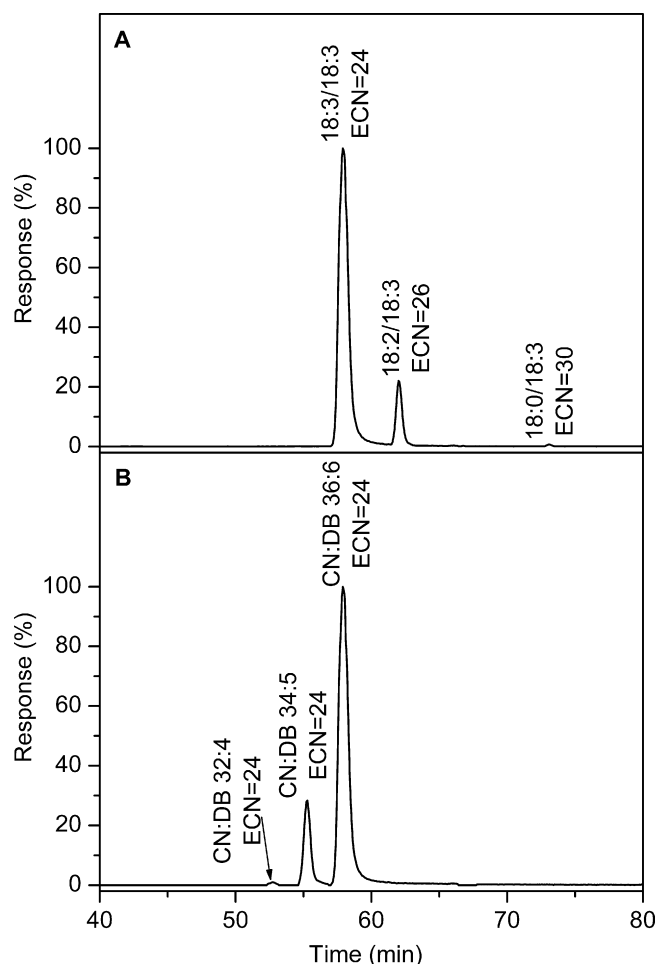


Fig. 7. The chromatogram of the MGDGs from *A. thaliana* reconstructed for m/z 797.5173 (MGDG 18:3/18:3, ECN = 24), m/z 799.5336 (MGDG 18:2/18:3, ECN = 26), and m/z 803.5655 (MGDG 18:0/18:3, ECN = 30) (A). The chromatogram of the MGDGs from *A. thaliana* reconstructed for m/z 745.4855 (MGDG 16:1/16:3, MGDG 18:3/14:1, CN:DB = 32:4), m/z 771.5023 (MGDG 18:3/16:2, MGDG 18:2/16:3, CN:DB = 34:5), and m/z 797.5173 (MGDG 18:3/18:3, CN:DB = 36:6), ECNs = 24 (B).

lipids. Using the optimised conditions, 55 MGDGs (24 non-oxidised, 31 oxidised) and 18 DGDGs (16 non-oxidised, 2 oxidised) were detected in *A. thaliana* and 25 MGDGs (15 non-oxidised, 10 oxidised) and 13 DGDGs (11 non-oxidised, 2 oxidised) in *M. officinalis*. The *A. thaliana* sample contained more galactolipid molecular species than *M. officinalis*, with a substantial number of them being oxidised. The total peak area of the oxidised lipids was much lower than that of the non-oxidised; the oxidised species formed 17% of the MGDGs and 5% of the DGDGs in *A. thaliana*. Some oxidised species with the same molecular formula detected in both plants were obviously dissimilar, as their retention times and mass spectra were slightly different (e.g., MGDG $C_{18}H_{30}O_3/18:3$ eluting in 38.45 min in *A. thaliana* and 38.11 min in *M. officinalis*). *A. thaliana* belongs to the family *Brassicaceae* classified as ‘16:3 plants’, whereas *M. officinalis* belongs to the family *Lamiaceae* classified as ‘18:3 plants’ (Mongrand et al., 1998). Our data were in agreement with this categorisation; the most abundant MGDG in *A. thaliana* was MGDG 18:3/16:3 (rel. peak area 38.86%) whereas the most abundant MGDG in *M. officinalis* was MGDG 18:3/18:3 (rel. peak area 61.38%).

A. thaliana is a widely used plant model. The major galactolipid components identified in this work (Tables S1 and S3) were in a good agreement with the earlier published data. However, roughly half of the twenty-four non-oxidised MGDGs detected in our work

have not been described previously. The total peak area of the newly identified MGDGs was rather small (1.7% rel), but the FA composition of these species was interesting because of the presence of odd carbon number acids (MGDG 17:3/18:3; MGDG 18:3/19:2) or highly polyunsaturated acids (MGDG 18:4/16:3; MGDG 16:4/18:3). The identity of several MGDGs analysed by a low resolution mass spectrometry (Welti et al., 2003; Welti and Wang, 2004; Devaiah et al., 2006) was not confirmed. For instance, MGDG molecular species 38:4 (number of carbons: number of double bonds) and 38:5 were not found; instead, oxidised galactolipids with the same nominal masses were identified based on accurate masses (MGDG $C_{18}H_{30}O_4/18:3$ and MGDG $C_{18}H_{28}O_4/18:3$). The same oxidised species were very recently reported in other study based on high resolution MS (Vu et al., 2012). Good agreement with the detected lipids and literature data was observed also in case of non-oxidised DGDGs. We newly identified one compound (DGDG 18:3/14:0). The uncertainty of the low resolution MS-based identifications is obvious also in case of DGDGs. For instance, DGDG 38:4 identified from low resolution spectra (Welti and Wang, 2004) was not found in this work. However, an oxidised DGDG $C_{18}H_{30}O_4/18:3$ with the same nominal mass existed. A recent paper of Ibrahim et al. (2011) showed that stressed *A. thaliana* produces both the above mentioned DGDGs (non-oxidised and oxidised) with the same nominal mass ($M=968$).

The most abundant oxidised galactolipids in *A. thaliana* contained two extra oxygens in FA; in MGDGs, they constituted 10.6% of the total peak area. The structure of the oxidised lipids and their origin (enzymatic processes or autooxidation) were not studied in detail. However, the elemental composition of many oxidised species was consistent with previously published oxylipins, e.g., with MGDG oPDA/dn-oPDA (or arabidopside A; $t_R=10.14$), MGDG oPDA/oPDA (or arabidopside B; $t_R=14.52$), MGDG C18-ketol/16:3 ($t_R=22.57$ and 28.87), MGDG oPDA/16:3 ($t_R=26.10$), or MGDG oPDA/18:3 ($t_R=40.03$); (Göbel and Feussner, 2009), see Tables S1 and S3.

Considerably fewer MGDG and DGDG molecular species were identified in *M. officinalis* leaves (Tables S2 and S4). To the best of our knowledge, this work is the first to report MGDGs and DGDGs in this plant. Most of them were even-carbon FA, but some minor species contained FA with seventeen carbons and up to three double bonds. The even number of carbons may indicate branched acyl chains (Ibrahim et al., 2011). In case of the oxidised MGDGs, the minor components also contained short chain acids (C10, C13 and C15 oxidised FAs). Interestingly, the elemental compositions indicated that dn-oPDA and oPDA might be present in some MGDG species. These cyclopentenone-containing FAs were previously identified only in *A. thaliana* and *Arabidopsis arenosa* (Böttcher and Weiler, 2007).

4. Conclusions

The low resolution MS/MS spectra of MGDGs and DGDGs did not allow us to reliably decide if they represent molecular species with non-oxidised or oxidised FA chain(s). High resolution analysis providing spectra with accurate masses was found to be essential for correct interpretation of MS data. The elution order of non-oxidised molecular species separated in the chromatographic systems optimized in this work followed the ECN values. The oxidised MGDGs or DGDGs eluted earlier than corresponding non-oxidised galactolipids with the same nominal mass. Therefore, elution order is an important clue that can help when only low resolution instruments are available.

The study of chromatographic behaviour and mass spectra allowed us to develop HPLC/MS/MS methods for detailed characterization of MGDGs and DGDGs including oxidised species. Some

spectral features were described for the first time. The optimised methods allowed us to detect a high number of galactolipid molecular species in the *A. thaliana* and *M. officinalis* samples; a number of them have been described for the first time. The oxidised galactolipids were detected at relatively high levels in spite of the fact that the plants were not intentionally stressed before collecting the samples. Interestingly, *M. officinalis* is likely another plant species biosynthesizing oxylipins with cyclopentenone ring.

Acknowledgements

Financial support from the CSF (Project No. 203/09/0139), the ASCR (Project No. Z4 055 0506), the CU Grant Agency (Project No. SVV 2012-265201), the MEYS (Projects No. MSM0021620857) is acknowledged. The authors thank to Petr Maršík and Přemysl Landa for their help with plant cultivation and Mr Sean Mark Miller for proofreading the manuscript and making corrections.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.chemphyslip.2012.03.002.

References

- Andersson, M.X., Hamberg, M., Kourtchenko, O., Brunnström, Å., McPhail, K.L., Gerwick, W.H., Göbel, C., Feussner, I., Ellerström, M., 2006. Oxylipin profiling of the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana*, formation of a novel oxophytodienoic acid containing galactolipid, Arabidopsis E. J. Biol. Chem. 281, 31528–31537.
- Andreou, A., Brodhun, F., Feussner, I., 2009. Biosynthesis of oxylipins in non-mammals. Prog. Lipid Res. 48, 148–170.
- Bergqvist, M.H.J., Kaufmann, P., 1996. Analysis of cereal digalactosyldiacylglycerol molecular species by high-performance liquid chromatography. J. Am. Oil Chem. Soc. 73, 211–217.
- Böttcher, Ch., Weiler, E.W., 2007. cyclo-Oxylipin-galactolipids in plants: occurrence and dynamics. Planta 226, 629–637.
- Buseman, M.Ch., Tamura, P., Sparks, A.A., Baughman, E.J., Maatta, S., Zhao, J., Roth, M.R., Esch, S.W., Shah, J., Williams, T.D., Welti, R., 2006. Wounding stimulates the accumulation of glycerolipids containing oxophytodienoic acid and dinor oxophytodienoic acid in *Arabidopsis* leaves. Plant Physiol. 142, 28–39.
- Deschamps, F.S., Gaudin, K., Baillet, A., Chaminade, P., 2004. Wheat digalactosyldiacylglycerol molecular species profiling using porous graphitic carbon stationary phase. J. Sep. Sci. 27, 1313–1322.
- Devaiah, S.P., Roth, M.R., Baughman, E., Li, M., Tamura, P., Jeannotte, R., Welti, R., Wang, X., 2006. Quantitative profiling of polar glycerolipid species from organs of wild-type *Arabidopsis* and a phospholipase Dα1 knockout mutant. Phytochemistry 67, 1907–1924.
- Dörmann, P., 2006. Lipid synthesis, metabolism and transport. In: Wise, R.R., Hooper, J.K. (Eds.), The Structure and Function of Plastids. Springer, Netherlands, pp. 335–353.
- Gil, J.H., Hong, J., Choe, J.C., Kim, Y.H., 2003. Analysis of fatty acyl groups of diacyl galactolipid molecular species by HPLC/ESI-MS with in-source fragmentation. Bull. Korean Chem. Soc. 24, 1163–1168.
- Glauser, G., Grata, E., Rudaz, S., Wolfender, J.-L., 2008. High-resolution profiling of oxylipin-containing galactolipids in *Arabidopsis* extracts by ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 22, 3154–3160.
- Göbel, C., Feussner, I., 2009. Methods for the analysis of oxylipins in plants. Phytochemistry 70, 1485–1503.
- Guella, G., Frassanito, R., Mancini, I., 2003. A new solution for an old problem: the regiochemical distribution of the acyl chains in galactolipids can be established by electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. 17, 1982–1994.
- He, Rodgers, H., Marshall, R.P., Hsu, A.G., Ch, S., 2011. Algae polar lipids characterized by online liquid chromatography coupled with hybrid linear quadrupole ion trap/Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. Energy Fuels 25, 4470–4775.
- Heemskerk, J.W.M., Storz, T., Schmidt, R.R., Heinz, E., 1990. Biosynthesis of digalactosyldiacylglycerol in plastids from 16:3 and 18:3 plants. Plant Physiol. 93, 1286–1294.
- Hisamatsu, Y., Goto, N., Hasegawa, K., Shigemori, H., 2003. Arabidopsides A and B, two new oxylipins from *Arabidopsis thaliana*. Tetrahedron Lett. 44, 5553–5556.
- Hisamatsu, Y., Goto, N., Sekiguchi, M., Hasegawa, K., Shigemori, H., 2005. Oxylipins Arabidopsides C and D from *Arabidopsis thaliana*. J. Nat. Prod. 68, 600–603.
- Hölzl, G., Dörmann, P., 2007. Structure and function of glycolipids in plants and bacteria. Prog. Lipid Res. 46, 225–243.
- Christie, W.W., 2003. Reversed-phase high-performance liquid chromatography. In: Christie, W.W. (Ed.), Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids. Oily Press, England, pp. 309–315.
- Ibrahim, A., Schütz, A.-L., Galano, J.-M., Herrfurth, C., Feussner, K., Durand, T., Brodhun, F., Feussner, I., 2011. The alphabet of galactolipids in *Arabidopsis thaliana*. Front. Plant Sci. 2, doi:10.3389/fpls.2011.00095.
- Larsen, E., Kharazmi, A., Christensen, L.P., Christensen, S.B., 2003. An antiinflammatory galactolipid from rose hip (*Rosa canina*) that inhibits chemotaxis of human peripheral blood neutrophils in vitro. J. Nat. Prod. 66, 994–995.
- Lee, A.G., 2000. Membrane lipids: it's only a phase. Curr. Biol. 10, R377–R380.
- Li, H., Yan, X., Xu, J., Zhou, C., 2008. Precise identification of photosynthetic glycerolipids in microalga *Tetraselmis chuii* by UPLC-ESI-Q-TOF-MS. C-Life Sci. 51, 1101–1107.
- Maeda, N., Kokai, Y., Ohtani, S., Hada, T., Yoshida, H., Mizushima, Y., 2009. Inhibitory effects of preventive and curative orally administered spinach glycolipid fraction on the tumor growth of sarcoma and colon in mouse graft models. Food Chem. 112, 205–210.
- Maréchal, E., Block, M.A., Dorne, A.-J., Douce, R., Joyard, J., 1997. Lipid synthesis and metabolism in the plastid envelope. Physiol. Plantarum 100, 65–77.
- Mongrand, S., Bessoule, J.-J., Cabantous, F., Cassagne, C., 1998. The C_{16:3}/C_{18:3} fatty acid balance in photosynthetic tissues from 468 plant species. Phytochemistry 49, 1049–1064.
- Mosblech, A., Feussner, I., Heilmann, I., 2009. Oxylipins: structurally diverse metabolites from fatty acid oxidation. Plant Physiol. Biochem. 47, 511–517.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum 15, 473–497.
- Napolitano, A., Carbone, V., Saggese, P., Takagaki, K., Pizzi, C., 2007. Novel galactolipids from the leaves of *Ipomoea batatas* L. characterization by liquid chromatography coupled with electrospray ionization–quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. J. Agric. Food Chem. 55, 10289–10297.
- Pacetti, D., Boselli, E., Lucci, P., Frega, N.G., 2007. Simultaneous analysis of glycolipids and phospholipids molecular species in avocado (*Persea americana* Mill) fruit. J. Chromatogr. A 1150, 241–251.
- Reshef, V., Mizrahi, E., Maretzki, T., Silberstein, C., Loya, S., Hizi, A., Carmeli, S., 1997. New acylated sulfolipids and digalactolipids and related known glycolipids from cyanobacteria with a potential to inhibit the reverse transcriptase of HIV-1. J. Nat. Prod. 60, 1251–1260.
- Stelmach, B.A., Müller, A., Hennig, P., Gebhardt, S., Schubert-Zsilavecz, M., Weiler, E.W., 2001. A novel class of oxylipins, sn1-O-(12-oxophytodienoyl)-sn2-O-(hexadecatrienoyl) monogalactosyl diglyceride, from *Arabidopsis thaliana*. J. Biol. Chem. 276, 12832–12838.
- Vu, H.S., Tamura, P., Galeva, N.A., Chaturvedi, R., Roth, M.R., Williams, T.D., Wang, X., Shah, J., Welti, R., 2012. Direct infusion mass spectrometry of oxylipin-containing arabidopsis membrane lipids reveals varied patterns in different stress responses. Plant Physiol. 158, 324–339.
- Welti, R., Wang, X., Williams, T.D., 2003. Electrospray ionization tandem mass spectrometry scan modes for plant chloroplast lipids. Anal. Biochem. 314, 149–152.
- Welti, R., Wang, X., 2004. Lipid species profiling: a high-throughput approach to identify lipid compositional changes and determine the function of genes involved in lipid metabolism and signaling. Curr. Opin. Plant Biol. 7, 337–344.
- Xu, J., Chen, D., Yan, X., Chen, J., Zhou, C., 2010. Global characterization of the photosynthetic glycerolipids from a marine diatom *Stephanodiscus* sp. by ultra performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization–quadrupole-time of flight mass spectrometry. Anal. Chim. Acta 663, 60–68.
- Yamauchi, R., Kojima, M., Kato, K., Ueno, Y., 1983. Autooxidation products of polyunsaturated galactolipids. Agric. Biol. Chem. 47, 2625–2630.
- Yao, H., Shi, Y., Gao, R., Zhang, G., Zhang, R., Zheng, C., Xu, B., 2006. Isolation of lipids from photosystem I complex and its characterization with high performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. B 837, 101–107.

SUPPLEMENTARY DATA

M. Zábranská, V. Vrkoslav, J. Sobotníková, J. Cvačka, Analysis of plant galactolipids by reversed-phase high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with accurate mass measurement, *Chemistry and Physics of Lipids*, **2012**

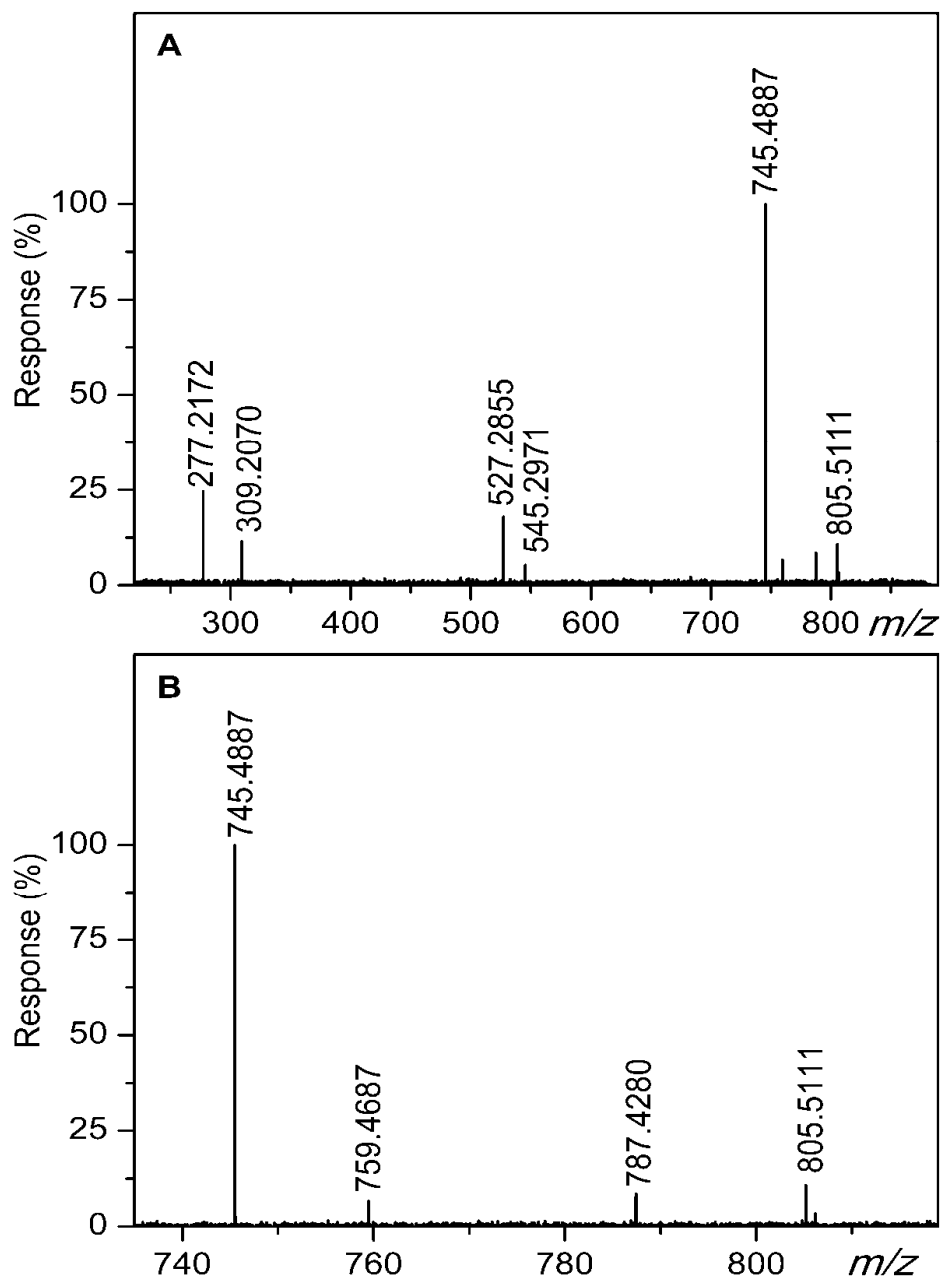


Figure S1. The CID negative ion mode MS/MS spectrum of an oxidised MGDG $C_{18}H_{30}O_4/18:3$ (m/z 805.5111 [M-H]⁻, $t_R=38.08$ min) from *A. thaliana*) (A) and enlarged high-mass region of this spectrum (B).

Table S1. MGDGs identified in *Arabidopsis thaliana*.

t_R (min)	m/z [M+Na] ⁺	Molecular formula	Fatty acids <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2	CN:DB	ECN	Relative peak area (%)
10.14	797.4447	C ₄₃ H ₆₆ O ₁₂	C ₁₈ H ₂₈ O ₃ / C ₁₆ H ₂₄ O ₃			0.12
10.67	663.3708 ⁿ	C ₃₄ H ₅₆ O ₁₁	C ₉ H ₁₆ O ₃ /16:3			0.10
11.66	675.3706 ⁿ	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₁	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ /16:3			0.19
13.02	663.3710 ⁿ	C ₃₄ H ₅₆ O ₁₁	C ₇ H ₁₂ O ₃ /18:3			0.06
13.77	675.3708 ⁿ	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₁	C ₈ H ₁₂ O ₃ /18:3			0.27
14.52	825.4752	C ₄₅ H ₇₀ O ₁₂	C ₁₈ H ₂₈ O ₃ / C ₁₈ H ₂₈ O ₃			0.10
17.46	715.4022 ⁿ	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₁	C ₁₃ H ₂₀ O ₃ /16:3			0.16
17.91	703.4022 ⁿ	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ /18:3			0.26
21.52	703.4022 ⁿ	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ /18:3			0.13
22.57	801.4751	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /16:3			0.19
23.25	799.4594 ⁿ	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₂	C ₁₈ H ₂₈ O ₄ /16:3			0.24
24.07	743.4340 ⁿ	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁	C ₁₅ H ₂₄ O ₃ /16:3			0.06
26.10	783.4645	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₁	C ₁₈ H ₂₈ O ₃ /16:3			0.23
28.87	801.4752	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /16:3			1.85
28.94	675.3717 ⁿ	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₁	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ /16:3			0.27
29.24	785.4819	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₁	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ /16:3			0.72
29.40	715.4034 ⁿ	C ₃₈ H ₆₀ O ₁₁	C ₁₃ H ₂₀ O ₃ /16:3			0.26
29.92	755.4346 ⁿ	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₁	C ₁₆ H ₂₄ O ₃ /16:3			0.30
29.92	801.4780	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₂	18:3/ C ₁₆ H ₂₆ O ₄			1.66
30.22	785.4813	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₁	18:3/ C ₁₆ H ₂₆ O ₃			0.98
30.74	829.5081	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /18:3			0.21
31.19	801.4770	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₂	18:3/ C ₁₆ H ₂₆ O ₄			2.67
31.87	675.3724 ⁿ	C ₃₅ H ₅₆ O ₁₁	C ₈ H ₁₂ O ₃ /18:3			0.19
34.27	827.4917 ⁿ	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₂	C ₁₈ H ₂₈ O ₄ /18:3			0.08
37.26	703.4032 ⁿ	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ /16:3			0.20
37.26	829.5066	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /18:3			2.00
37.63	743.4347 ⁿ	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁	C ₁₃ H ₂₀ O ₃ /18:3			0.19
38.08	829.5066	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /18:3			1.52
38.16	783.4660	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₁	C ₁₆ H ₂₄ O ₃ /18:3			0.27
38.45	813.5132	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₁	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ /18:3			1.03
40.03	811.4966	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₁	C ₁₈ H ₂₈ O ₃ /18:3			0.57
42.72	741.4540 ⁿ	C ₄₁ H ₆₆ O ₁₀	16:3/16:3	32:6	20	0.33
46.93	767.4699 ⁿ	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₀	18:4/16:3	34:7	20	
46.93	767.4699 ⁿ	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₀	16:4/18:3	34:7	20	0.09
47.08	755.4698 ⁿ	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₀	17:3/16:3	33:6	21	0.31
47.67	743.4695 ⁿ	C ₄₁ H ₆₈ O ₁₀	16:2/16:3	32:5	22	0.20
50.74	769.4862	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₀	18:3/16:3	34:6	22	38.86
52.74	745.4855 ⁿ	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₀	16:1/16:3	32:4	24	
52.74	745.4855 ⁿ	C ₄₁ H ₇₀ O ₁₀	18:3/14:1	32:4	24	0.21
54.62	783.5031 ⁿ	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₀	17:3/18:3	35:6	23	0.26
55.29	771.5023	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₀	18:3/16:2	34:5	24	
55.29	771.5023	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₀	18:2/16:3	34:5	24	5.72
57.90	797.5173	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₀	18:3/18:3	36:6	24	27.67
59.54	773.5186	C ₄₃ H ₇₄ O ₁₀	18:2/16:2	34:4	26	1.46
59.61	747.5027 ⁿ	C ₄₁ H ₇₂ O ₁₀	18:3/14:0	32:3	26	0.20
62.01	799.5336	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₀	18:2/18:3	36:5	26	3.95
64.78	825.5503	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₀	20:3/18:3	38:6	26	0.10
65.45	813.5502 ⁿ	C ₄₆ H ₇₈ O ₁₀	18:3/19:2	37:5	27	0.10
65.97	775.5344	C ₄₃ H ₇₆ O ₁₀	16:0/18:3	34:3	28	
65.97	775.5344	C ₄₃ H ₇₆ O ₁₀	18:2/16:1	34:3	28	2.47
66.81	801.5503	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₀	18:2/18:2	36:4	28	0.31
69.97	777.5501	C ₄₃ H ₇₈ O ₁₀	18:1/16:1	34:2	30	
69.97	777.5501	C ₄₃ H ₇₈ O ₁₀	16:0/18:2	34:2	30	0.42
73.12	803.5655	C ₄₅ H ₈₀ O ₁₀	18:0/18:3	36:3	30	0.12
74.70	779.5658	C ₄₃ H ₈₀ O ₁₀	18:1/16:0	34:1	32	0.14

ⁿ Newly identified species.

Table S2. MGDGs identified in *Melissa officinalis*.

t_R (min)	m/z [M+Na] ⁺	Molecular formula	Fatty acids <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2	CN:DB	ECN	Relative peak area (%)
17.48	703.4022	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ /18:3			0.03
32.21	771.4653	C ₄₂ H ₆₈ O ₁₁	C ₁₅ H ₂₄ O ₃ /18:3			0.04
36.84	829.5067	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /18:3			1.53
37.14	703.4033	C ₃₇ H ₆₀ O ₁₁	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ /18:3			0.11
37.29	743.4348	C ₄₀ H ₆₄ O ₁₁	C ₁₃ H ₂₀ O ₃ /18:3			0.17
37.81	829.5084	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₂	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /18:3			1.18
37.89	783.4660	C ₄₃ H ₆₈ O ₁₁	C ₁₆ H ₂₄ O ₃ /18:3			0.18
38.11	813.5132	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₁	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ /18:3			0.39
39.93	811.4963	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₁	C ₁₈ H ₂₈ O ₃ /18:3			0.34
44.76	813.5118	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₁	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ /18:3			0.40
50.69	769.4859	C ₄₃ H ₇₀ O ₁₀	18:3/16:3	34:6	22	0.44
54.07	795.5011	C ₄₅ H ₇₂ O ₁₀	18:3/18:4	36:7	22	0.14
54.44	783.5024	C ₄₄ H ₇₂ O ₁₀	17:3/18:3	35:6	23	1.33
55.12	771.5023	C ₄₃ H ₇₂ O ₁₀	16:2/18:3	34:5	24	0.49
57.95	797.5176	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₀	18:3/18:3	36:6	24	61.38
59.54	773.5186	C ₄₃ H ₇₄ O ₁₀	16:1/18:3	34:4	26	3.50
61.89	799.5338	C ₄₅ H ₇₆ O ₁₀	18:2/18:3	36:5	26	14.03
63.24	787.5342	C ₄₄ H ₇₆ O ₁₀	17:1/18:3	35:4	27	0.57
64.59	825.5497	C ₄₇ H ₇₈ O ₁₀	20:3/18:3	38:6	26	0.79
65.26	813.5488	C ₄₆ H ₇₈ O ₁₀	18:3/19:2	37:5	27	0.18
65.93	775.5337	C ₄₃ H ₇₆ O ₁₀	16:0/18:3	34:3	28	8.15
66.88	801.5494	C ₄₅ H ₇₈ O ₁₀	18:1/18:3	36:4	28	2.52
69.90	777.5499	C ₄₃ H ₇₈ O ₁₀	16:0/18:2	34:2	30	0.95
70.72	803.5653	C ₄₅ H ₈₀ O ₁₀	18:1/18:2	36:3	30	0.38
73.03	803.5649	C ₄₅ H ₈₀ O ₁₀	18:0/18:3	36:3	30	0.78

Table S3. DGDGs identified in *Arabidopsis thaliana*.

t_R (min)	m/z [M+Na] ⁺	Molecular formula	Fatty acids <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2	CN:DB	ECN	Relative peak area (%)
22.15	975.5643	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₆	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ /18:3			2.31
22.45	991.5599	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₇	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /18:3			2.66
35.01	931.5392	C ₄₉ H ₈₀ O ₁₅	18:3/16:3	34:6	22	7.96
38.89	945.5540	C ₅₀ H ₈₂ O ₁₅	17:3/18:3	35:6	23	0.36
40.84	933.5540	C ₄₉ H ₈₂ O ₁₅	16:2/18:3	34:5	24	1.98
42.70	959.5693	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₅	18:3/18:3	36:6	24	47.29
45.77	909.5544 ⁿ	C ₄₇ H ₈₂ O ₁₅	18:3/14:0	32:3	26	0.14
46.59	935.5703	C ₄₉ H ₈₄ O ₁₅	18:3/16:1	34:4	26	
46.59	935.5703	C ₄₉ H ₈₄ O ₁₅	18:2/16:2	34:4	26	0.73
48.15	961.5851	C ₅₁ H ₈₆ O ₁₅	18:2/18:3	36:5	26	4.66
50.08	987.6022	C ₅₃ H ₈₈ O ₁₅	20:3/18:3	38:6	26	0.60
53.71	963.6007	C ₅₁ H ₈₈ O ₁₅	18:2/18:2	36:4	28	
53.71	963.6007	C ₅₁ H ₈₈ O ₁₅	18:1/18:3	36:4	28	0.43
54.60	937.5851	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₅	18:3/16:0	34:3	28	24.32
58.40	951.6007	C ₅₀ H ₈₈ O ₁₅	17:0/18:3	35:3	29	0.43
59.57	939.6008	C ₄₉ H ₈₈ O ₁₅	18:2/16:0	34:2	30	4.55
61.49	965.6162	C ₅₁ H ₉₀ O ₁₅	18:0/18:3	36:3	30	1.04
63.65	941.6181	C ₄₉ H ₉₀ O ₁₅	18:1/16:0	34:1	32	0.55

ⁿ Newly identified species.

Table S4. DGDGs identified in *Melissa officinalis*.

t_R (min)	m/z [M+Na] ⁺	Molecular formula	Fatty acids <i>sn</i> -1/ <i>sn</i> -2	CN:DB	ECN	Relative peak area (%)
22.27	975.5643	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₆	C ₁₈ H ₃₀ O ₃ /18:3			0.44
22.57	991.5599	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₇	C ₁₈ H ₃₀ O ₄ /18:3			1.17
38.98	945.5539	C ₅₀ H ₈₂ O ₁₅	17:3/18:3	35:6	23	0.33
42.65	959.5707	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₅	18:3/18:3	36:6	24	46.76
46.66	935.5696	C ₄₉ H ₈₄ O ₁₅	18:3/16:1	34:4	26	1.28
48.22	961.5853	C ₅₁ H ₈₆ O ₁₅	18:2/18:3	36:5	26	6.68
50.08	987.6006	C ₅₃ H ₈₈ O ₁₅	20:3/18:3	38:6	26	0.45
53.50	963.6011	C ₅₁ H ₈₈ O ₁₅	18:2/18:2	36:4	28	0.96
54.47	937.5851	C ₄₉ H ₈₆ O ₁₅	16:0/18:3	34:3	28	32.94
58.40	951.6007	C ₅₀ H ₈₈ O ₁₅	17:0/18:3	35:3	29	0.52
59.52	939.6011	C ₄₉ H ₈₈ O ₁₅	16:0/18:2	34:2	30	4.00
60.48	965.6162	C ₅₁ H ₉₀ O ₁₅	18:0/18:3	36:3	30	1.48
61.37	965.6165	C ₅₁ H ₉₀ O ₁₅	18:0/18:3	36:3	30	2.99